

62

Cultures organotypiques de peau humaine étude ultrastructurale

par

Annie BIETRY

1975

EXTRAIT
des Annales Scientifiques de l'Université
de Besançon, Zoologie, Physiologie &
Biologie animale, 3e série, fasc. 11.,
1974



Cultures organotypiques de peau humaine étude ultrastructurale

PAR

Annie BIETRY*

SOMMAIRE

Introduction

CHAPITRE I : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	141
A. Rappel des caractères essentiels de la peau	141
B. Les cultures de peau	142
1. Les différents types de cultures	
a) Les cultures cellulaires	142
b) La culture tissulaire	142
c) La culture organotypique	142
2. Cultures organotypiques de peau	143
a) La kératinisation <i>in vitro</i>	143
b) Le renouvellement de l'épiderme	143
c) L'épidermisation et la migration cellulaire au cours de la cicatrisation	144

* Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie, ERA au CNRS n°229 - Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Besançon.

** Cet article correspond à la partie principale d'une thèse de 3ème cycle en Sciences Biologiques (mention Biologie Animale) soutenue le 15 mars 1975 à la Faculté des Sciences de Besançon et portant le n° d'ordre 222.



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A. Prélèvement de la peau et préparation des explants	145
B. Méthodes de culture	
1ère méthode	145
2ème méthode	145
C. Techniques histologiques	
1. Microscopie photonique	145
2. Microscopie électronique	146

CHAPITRE III : RESULTATS PERSONNELS

A. La peau humaine adulte avant la mise en culture	
1. Etude histologique	147
2. Ultrastructure	147
B. Comportement de la peau humaine adulte en culture organotypique	
1. Sur le milieu de culture I	
a) L'épiderme	148
b) Le derme	149
2. Etude comparée de l'influence de la concentration du milieu en acides aminés et vitamines	
a) aspect histologique	149
b) ultrastructure des cellules des explants	149
3. Influence des autres facteurs	
a) facteurs sans effets notables	150
b) facteurs favorables à une meilleure survie	150
C. Croissance et différenciation de la peau humaine adulte et de nouveau-né <i>in vitro</i>	
1. Etude de l'évolution en histologie normale	150
2. Evolution de l'ultrastructure des explants	151
a) les couches profondes de l'épiderme et la jonction dermo-épidermique	151
b) les couches superficielles de l'épiderme	151

CHAPITRE IV : DISCUSSION - CONCLUSION

A. Importance des conditions de culture	153
B. Critères de croissance et de différenciation	153
Bibliographie	155
9 planches	160 à 177

INTRODUCTION

Chez l'homme l'expérimentation n'étant guère possible, on a cherché un moyen d'analyser hors de l'organisme les phénomènes vivants. Les cultures cellulaires, tissulaires et organotypiques offrent à cet égard d'intéressantes possibilités comme le pressentait déjà Carrel (1912) cet admirable pionnier des cultures à qui la biologie doit tant.

Les cultures organotypiques présentent l'avantage de conserver l'intégrité des structures des explants et permettent d'étudier un phénomène particulier en dehors de l'influence d'autres organes. La peau constitue un organe de choix, car il est facile de s'en procurer sans inconvénient pour le donneur.

Les cultures organotypiques de peau humaine peuvent être envisagées pour l'étude de virus qui se développent dans les cellules de peau et dont certains,

comme celui des verrues, sont encore peu connus. Nous avons abordé ce problème et réalisé des cultures de peau humaine adulte pour maintenir *in vitro* un système virus - tumeur bénigne humaine pour l'étude des interactions virus - cellule hôte. Mais la phase de stockage des verrues en vue de l'extraction d'une quantité suffisante de virus s'avère longue. Aussi, nous avons procédé à la mise en culture de peau normale afin d'étudier son évolution sans "ensemencement" viral afin de vérifier ensuite chez l'homme l'hypothèse de Summerlin et coll. (1970-1973) selon laquelle des fragments de peau de souris maintenus en culture organotypique perdent leurs propriétés antigéniques et sont acceptés par un autre individu que le donneur. Dans ses travaux, cet auteur n'étudiait pas l'ultrastructure des explants, c'est pourquoi nous avons entrepris de suivre l'évolution en microscopie électronique des explants cultivés.

De nombreux auteurs se sont déjà penchés sur ces problèmes et nous rappellerons leurs travaux et leurs résultats avant d'exposer nos résultats personnels.

CHAPITRE I

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

A. RAPPEL DES CARACTERES ESSENTIELS DE LA PEAU

La peau qui sert de frontière entre notre corps et le monde extérieur, joue un rôle important dans notre organisme. Elle est formée de deux tissus : l'épiderme et le derme séparés par la membrane basale.

L'épiderme est en état permanent de régénération ; il possède à la base une population permanente de cellules germinatives qui migrent peu à peu vers la surface, en subissant une différenciation d'un mode spécifique : la kératinisation, à la fin de laquelle elles sont exfoliées. Alors que ces cellules épidermiques ou kératinocytes voient décroître leur activité mitotique, leur spécialisation commence et elles synthétisent des protéines fibreuses et amorphes. Les kératinocytes embryonnaires puis adultes ont été récemment décrits en microscopie électronique par MATSUNAKA et MISHIMA (1969), BREATHNACH (1970-71), MAZUCCA et AGACHE

(1970), PORTER et BONNEVILLE (1969). Histologiquement la kératinisation a été étudiée en particulier par ZELICKSON (1967) et PARRAKAL et ALEXANDER (1974). La population de kératinocytes est largement majoritaire dans l'épiderme. C'est elle qui, nous intéressant directement, fera plus loin l'objet d'une description détaillée.

En plus des kératinocytes, l'épiderme comprend trois autres populations de cellules :

- les mélanocytes, issus des crêtes neurales, caractérisés d'une part par l'absence de tonofibrilles et de desmosomes, d'autre part, par la présence de mélanosomes, qui sont le siège de la synthèse de la mélanine (PRUNIERAS, 1971).

- Les cellules de Langerhans qui se distinguent des kératinocytes environnants par leur noyau indenté, l'absence de desmosomes le long de leur membrane plasmique, l'absence de fibrilles dans leur cytoplasme et la présence d'inclusions cytoplasmiques caractéristiques

en forme de bâtonnets (BASSET, 1970 ; REAMS et TOMPKINS, 1973).

— Les cellules de Merkel considérées comme cellules sensorielles (WINKELMANN, 1973) caractérisées par un noyau indaté, un cytoplasme clair et présentant des expansions dans les cellules épidermiques, la présence de desmosomes et de granules entourés d'une membrane dense, à proximité des terminaisons nerveuses.

Grâce à une nouvelle technique de cryodécapage, ces divers éléments peuvent être observés en relief au microscope à balayage qui permet d'examiner les tissus dans un état proche de l'état vivant puisqu'ils n'ont pas besoin d'être fixés ni déshydratés. C'est ainsi que BREATHNACH (1972) et ses collaborateurs ont examiné sous un angle nouveau la peau humaine adulte, postnatale et foetale.

Les trois caractères essentiels de la peau qui découlent des observations microscopiques sont :

- 1) la présence d'une population de cellules germinatives basales à activité mitotique,
- 2) la maturation des cellules en couches de Malpighi et granuleuse,
- 3) l'élaboration de la couche cornée.

Afin de déceler les mécanismes de la différenciation épidermique aboutissant à la kératinisation BERNSTEIN (1970) a étudié les modifications biochimiques qui accompagnent les changements morphologiques. La synthèse d'histidine toujours associée à la kératohyaline est vraisemblablement indispensable à la kératinisation.

L'un des problèmes les plus importants est celui du contrôle du maintien de ces structures. Il est probable que celui-ci est conditionné par des interactions dermo-épidermiques comme le sont les phénomènes de morphogenèse embryonnaire. Les méthodes employées pour étudier ces interactions sont soit la culture organotypique, soit les greffes. Les travaux de BRIGGAMAN et coll (1968-71) répondent à des préoccupations comparables et tentent de préciser quelle est la nature de l'influence dermique. Cet auteur suit le comportement de l'épiderme isolé ou réassocié au derme en greffes chorioallantoïdiennes sur l'embryon de poulet. Il constate que l'épiderme ne doit pas être éloigné de plus de 25 μ du derme sinon le facteur dermique ne peut plus agir. D'après lui, seule la peau totale peut être maintenue dans son intégrité par diverses techniques telles que la culture organotypique alors que les cellules épidermiques en l'absence de derme peuvent croître *in vitro* mais ne

présentent aucune organisation.

L'analyse des interactions dermo-épidermiques a été entreprise par BILLINGHAM et SILVERS (1963-1967-1973) par la méthode des greffes hétérotypiques de combinaisons de fragments dermiques et épidermiques provenant de régions différentes chez le cobaye, le hamster ou le lapin. Ces auteurs ont ainsi révélé différents "gènes épidermiques".

B. LES CULTURES DE PEAU

1) Les différents types de cultures

La peau comme tous les autres organes, peut donner lieu à trois types de culture *in vitro* : les cultures cellulaires, tissulaires ou organotypiques.

a) Les cultures cellulaires sont réalisées à partir d'une suspension de cellules épidermiques préparée par trypsinisation de tranches de peau. On sépare tout d'abord le derme de l'épiderme, puis par prolongation de l'action de la trypsine l'épiderme est dissocié en cellules qui sont mises en culture. PRUNIÉRAS (1965-1968) a ainsi mis au point une technique de culture de cellules dissociées afin d'étudier le comportement des cellules malpighiennes, dentritiques, mélanocytaires et les relations existant entre elles.

b) La culture tissulaire appelée aussi histiotypique a été définie par CARREL dès 1911 : elle consiste en "un milieu au plasma inoculé avec de petits fragments de tissu vivant". Ce type de culture est caractérisé par la migration autour de l'explant de cellules qui forment des nappes cellulaires dont des fragments peuvent être transplantés à leur tour dans un milieu neuf et produire une génération nouvelle de cellules. Ces nappes cellulaires permettent l'étude des interrelations dynamiques entre les cellules. Pour WOLFF (1956) le but de ces cultures est d'obtenir la prolifération durable de cellules d'un type choisi. KARASEK (1967), KARASEK et CHARLTON (1971) étudie sur la peau post-embryonnaire humaine les facteurs physiques et chimiques de la croissance épithéliale.

c) La culture organotypique consiste à maintenir sur milieu solide ou liquide dans une atmosphère gazeuse convenable des fragments de peau constitués de l'épiderme et de la partie supérieure du derme. Clairement située par CARREL par rapport aux deux types précédents "la culture d'organes n'est nullement destinée à remplacer la culture des cellules et des tissus. Elle diffère de cette dernière par ses techniques autant que par son objet. Elle s'applique à l'étude des sociétés cellulaires

organisées et non pas des cellules”.

2) Cultures organotypiques de peau

La peau s'adapte particulièrement bien aux méthodes de cultures organotypiques ; ses dimensions naturelles font qu'il est possible de préparer de minces tranches.

Les premières cultures de peau de mammifère adulte ont été effectuées par MEDAWAR (1948), CRUICKSHANK (1954), TROWELL (1959). L'histoire complète des travaux réalisés jusqu'en 1965 est présentée dans les ouvrages généraux de PRUNIERAS (1965) et de WILLMER (1966). Les recherches récentes abordées par cette méthode concernent surtout la kératinisation, le renouvellement naturel de l'épiderme ou la cicatrisation.

a/ La kératinisation *in vitro*

L'apparition de la kératinisation dans la peau foetale a été étudiée chez le porc par CHANG et MAIBACH (1967), chez l'homme par Mc GOWAN et BANG (1960) et PULLAR (1965), plus récemment par BAUER et KUYPER (1972), BAUER (1972) chez la souris.

Ce même processus a été également étudié sur la peau humaine adulte *in vitro* puis comparé à ce qui se passe *in vivo* (MONTAGNA et LOBITZ, 1964).

La peau humaine adulte ou post-embryonnaire a été cultivée suivant diverses techniques de cultures organotypiques variant d'un laboratoire à l'autre, selon les buts envisagés. Le plus souvent les auteurs recherchent un modèle expérimental permettant de tester l'action de diverses substances.

LASNITZKI (1964) étudie l'action des carcinogènes, des hormones et des vitamines sur des cultures organotypiques de peau. Des explants de peau de cobaye adulte cultivés en présence de fortes doses de vitamine A subissent des changements décrits par BARNETT et SZABO (1973) : formation de microvillosités avec une surface filamenteuse, inhibition de la kératinisation, abaissement du nombre et de la taille des faisceaux de tonofilaments et des desmosomes, élargissement des espaces intercellulaires et apparition de tight-junctions.

HAMBRICK et coll. (1966) étudie l'influence des mucopolysaccharides. L'addition de glucosamine au milieu de culture provoque la formation d'une épaisse couche cellulaire granuleuse. L'addition d'héparine conduit à la formation d'un stratum corneum qui apparaît normal. HAMBRICK et HANDWERGER (1969) compare ensuite ses résultats avec le comportement d'explants de peau psoriasique *in vitro* et détermine l'influence de ses diverses substances sur leur croissance.

Cette étude est d'un grand intérêt puisque le psoriasis est caractérisé par une hyperplasie épidermique et une kératinisation imparfaite. Des explants de peau psoriasique survivent pendant 5 semaines malgré une nécrose initiale d'une grande partie de l'épiderme. Cette survie dépend probablement des qualités hyperprolifératives de la cellule psoriasique (CARON, 1968).

Pour SARKANY et coll. (1965-70), les résultats optimaux sont obtenus avec un milieu synthétique enrichi de 50% de sérum humain ou de veau foetal frais. La croissance est manifeste pendant 9 à 11 jours, temps durant lequel la peau maintient son intégrité en tant qu'organe. Puis il décrit les deux principales altérations généralement rencontrées : la migration des cellules épidermiques autour du derme sous-jacent, processus connu sous le nom d'épibolie, et l'apparition d'une kératinisation anormale ou parakératose. Ces changements ont été décrits par le même auteur (1972) au microscope électronique pendant les trois premiers jours de culture. FRIEDMAN et coll. (1966), PROSE et coll. (1967) a comparé l'ultrastructure des cellules épidermiques de l'explant avec celle des cellules qui migrent. D'après ses propres expériences, OKOMURA (1967) conclut que le processus de kératinisation de l'épiderme cultivé *in vitro* diffère de celui de l'épiderme normal *in vivo*, mais on obtient un épiderme semblable à l'épiderme parakératotique *in vivo*.

Les effets de divers facteurs tels que la température, le pH, le stripping de la peau ont été étudiés par REAVEN et COX (1965-68). Le stripping de la peau, c'est-à-dire l'enlèvement des couches cornées, a pour effet d'accroître l'activité mitotique des explants. Cette stimulation de la synthèse d'ADN a été mesurée par autoradiographie (BISHOP et COX, 1974).

LEVINE (1972) étudie le rôle du sérum dans le milieu de culture organotypique de peau humaine adulte. La régénération d'un épiderme après 19 jours de culture a lieu en présence de 10% de sérum dans le milieu de culture. Le sérum favorise la synthèse d'ADN et le phénomène d'épibolie.

La migration cellulaire et l'activité mitotique sont les deux voies selon lesquelles les kératinocytes peuvent se mouvoir. Ces deux processus interviennent simultanément durant la cicatrisation (KRAWCZYK, 1971). La migration épidermique qui a lieu dans les premières 48 heures de culture organotypique n'est pas due à une augmentation de l'activité mitotique (MARKS et coll, 1972, MARKS et NISHIKAWA, 1973).

b) Le renouvellement de l'épiderme par les cellules basales a fait l'objet de nombreuses études qui sont basées sur l'identification autoradiographique des kéra-

tinocytes marqués par la thymidine tritiée pendant la période prémitotique de synthèse d'ADN. On pense généralement que dans l'épiderme normal, ce sont les cellules basales qui assurent le renouvellement des kératinocytes. Mais d'après KARATSCHAI et coll. (1971), seule une population de cellules définies géographiquement est impliquée activement dans la régénération de l'épiderme et les cellules marquées des couches supérieures sont vraisemblablement des cellules de Langerhans (SCHELLANDER et MARKS, 1973). L'influence de diverses substances sur l'activité mitotique a été testée par de nombreux auteurs (MANN, 1967 ; CARR et coll. 1973 ; GELFANT et CANDELAS, 1972 ; NISHIKAWA et coll. 1967, et MARKS, 1973 ; LAURENCE et coll. 1972, BULLOUGH et coll. 1967, et BULLOUGH, 1972 ; ROWE et DIXON, 1972). Bien que les hormones jouent un rôle certain, le contrôle principal semble assuré par une protéine spécifique : une chalone. D'après LAURENCE et coll. (1972) "la fonction primordiale d'une chalone est de forcer les cellules à devenir matures et à le rester, inhibant ainsi les mitoses". Le mécanisme d'action de la chalone est décrit par BULLOUGH (1972). Dans l'épiderme, la mitose est stimulée par un antagoniste des chalones, l'antichalone, qui est fournie par le derme et peut-être les fibroblastes (KARASEK et CHARLTON, 1971). L'AMP cyclique est probablement un des médiateurs du contrôle mitotique épidermique (VOORHEES et coll. 1973). Ces chalones peuvent contenir une ou plusieurs composantes mises en évidence par ELGJO (1972) ; les cellules basales contiennent un agent qui inhibe les cellules pendant la phase G_2 , prémitotique, tandis que les cellules kératinisées des couches supérieures de l'épiderme produisent un facteur qui agit sur les cellules pendant la phase G_1 postmitotique. Le derme ainsi que le sérum de souris frais neutralisent l'action des inhibiteurs de croissance épidermique

(ELGJO et EDGEHILL, 1973), d'où le rôle de ces deux éléments dans la croissance de la peau *in vitro*. Les chalones jouent un rôle important dans le développement des tumeurs et la cicatrisation des blessures (ARGYRIS, 1972).

c) L'épidermisation et la migration cellulaire au cours de la cicatrisation

La réépithélisation au cours de la cicatrisation a été étudiée en observant aux microscopes optique et électronique de petites incisions fermées ou ouvertes pratiquées expérimentalement dans la peau de rat par KRAWCZYK (1971). Les deux phénomènes essentiels impliqués sont la migration cellulaire et l'activité mitotique des cellules épidermiques. L'accroissement de cette dernière n'est observé qu'après 1 ou 2 jours, le phénomène principal étant la migration cellulaire qui joue un rôle capital dans la restauration de la continuité épidermique.

KRAWCZYK (1971) a proposé un modèle des mouvements des cellules épidermiques durant la cicatrisation. On observe tout d'abord un glissement des cellules épidermiques, puis la peau est intégralement reconstituée grâce à la synthèse des hémidesmosomes entre une cellule épidermique basale et la membrane basale et celle des desmosomes entre deux kératinocytes voisins. La séquence des événements morphologiques qui se succèdent au cours de la synthèse des hémidesmosomes et des desmosomes a été présentée par KRAWCZYK et WILGRAM (1973).

Des phénomènes analogues de migration cellulaire et d'activité mitotique sont aussi impliqués dans les processus de prise de greffe (RUDOLPH et KLEIN, 1973).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

A. PRELEVEMENT DE LA PEAU ET PREPARATION DES EXPLANTS

La peau est prélevée à la Clinique Dermatologique Universitaire de Besançon dirigée par le Professeur AGACHE. Les fragments de peau sont obtenus chirurgicalement ou à l'aide d'un dermatome électrique sur des personnes des 2 sexes et proviennent de la même région du corps dans la mesure du possible (bras ou cuisse).

La peau est "strippée" ou non puis soumise aux processus antiseptiques préopératoires. Le fragment de peau est recueilli dans un pilulier contenant du liquide de Tyrode stérile et des antibiotiques (1 000 UI pénicilline, 0,1 mg streptomycine), puis il est passé dans 2 autres bains de Tyrode contenant des concentrations d'antibiotiques décroissantes (500 UI pénicilline et 500 µg streptomycine ; 300 UI pénicilline et 300 µg streptomycine). Le fragment de peau est ensuite découpé en petits carrés de 2 x 2 mm environ et chaque explant est lavé dans 2 bains de Tyrode contenant des concentrations d'antibiotiques toujours décroissantes (200 UI pénicilline et 200 µg streptomycine ; 100 UI pénicilline et 100 µg streptomycine).

Environ 300 explants ont été mis en culture selon des méthodes et des milieux de culture différents.

Au cours d'expériences préliminaires 43 explants ont été cultivés sur le milieu gélosé de WOLFF et HAFEN (1952) mais celui-ci a été abandonné car il est moins favorable à la culture organotypique de peau humaine que les milieux liquides.

B. METHODES DE CULTURE

Les méthodes employées sont basées sur l'utilisation de milieux liquides synthétiques enrichis de liquides organiques naturels.

1ère méthode (dispositif de culture n° 1)

On utilise des boîtes pour cultures organotypiques commercialisées par la firme "FALCON". La cavité centrale est remplie par le milieu de culture qui affleure au niveau de la grille sur laquelle sont déposés les explants. On place un anneau de papier filtre imbibé d'eau

bidistillée stérile afin de maintenir l'atmosphère environnante humide. Les boîtes recouvertes d'un couvercle sont placées dans un incubateur humidifié maintenu à la température de 37°C et à un pH supérieur à 7,6. Le milieu de culture n° 1 est composé de la façon suivante :

- milieu de Eagle BEM (Institut Pasteur ou Mérieux) mis au point par EAGLE (1955) 50%
- + antibiotiques : 180 UI/ml pénicilline
20 µg/ml streptomycine
- jus d'embryon de poulet de 7 jours frais, dilué de moitié dans du liquide de Tyrode 25%
- sérum de cheval non inactivé (Difco) 25%

2ème méthode (dispositif de culture n° 2)

Les explants sont déposés sur une lamelle de verre dans une boîte de Pétri contenant 2 ml du milieu de culture n° 2 constitué de :

- milieu de Eagle MEM (Eurobio) mis au point par EAGLE (1959) 84 à 89%
- sérum de veau inactivé (Eurobio) 10 à 15%
- glutamine (14,6 mg/ml) (Eurobio) 1%
- antibiotiques : Pénicilline } Specia 100 UI/ml
Strepto- } (Diamant)
mycine } ou 100 µg/ml
Eurobio

Les explants ont été aussi placés sur une grille ou laissés flotter à la surface du milieu. Les boîtes sont déposées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère comprenant environ 5% CO₂ et 95% air, afin de maintenir le pH du milieu à 7,2 - 7,4.

Le milieu de Eagle MEM est plus riche en acides aminés que le BEM.

Le sérum de veau est inactivé par chauffage à 56°C pendant 30 minutes afin de détruire le complément des anticorps, toxique pour les cellules.

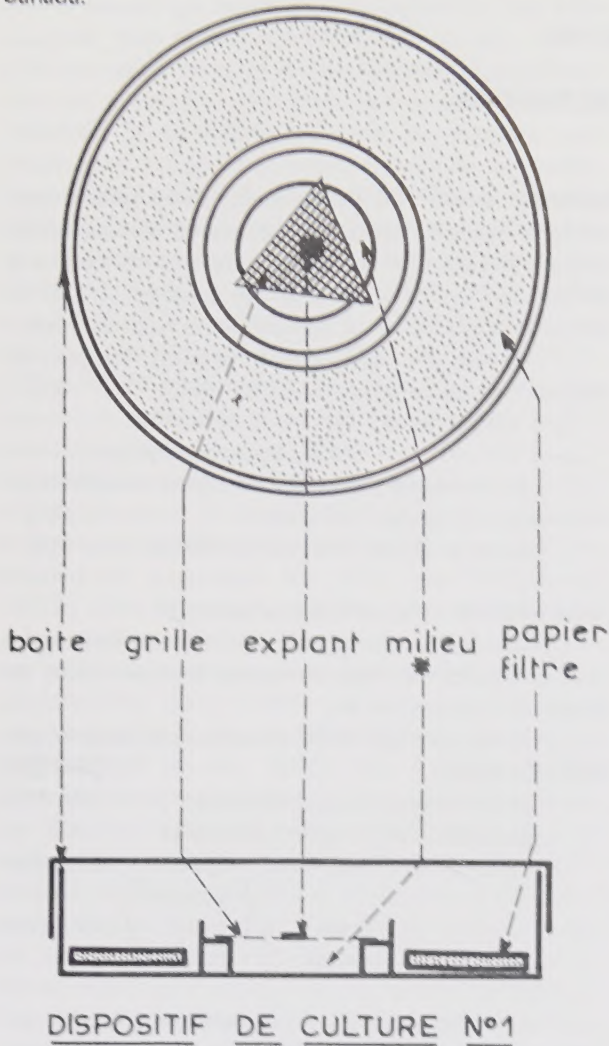
C. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

1) Microscopie photonique

Les explants sont fixés au Bouin Hollande pendant 3 jours. Après déshydratation par l'alcool éthylique et le butanol, ils subissent la double incubation : celloïdine -

paraffine. L'inclusion définitive se fait dans la paraffine.

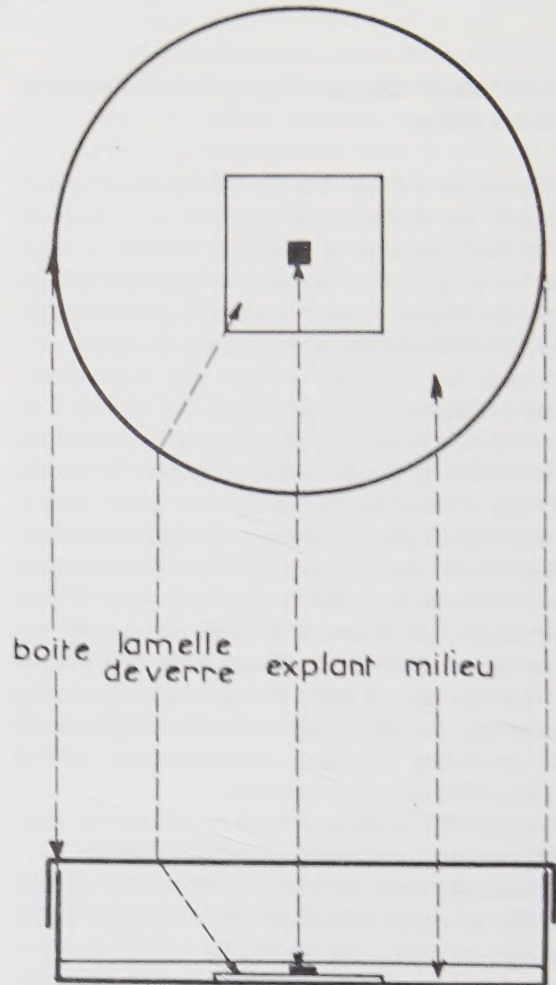
Les coupes de $4-5\mu$ d'épaisseur sont colorées au trichrome de Masson, puis montées au Baume du Canada.



* : le milieu affleure au niveau de la grille.

2) Microscopie électronique

Les explants subissent la double fixation : glutaraldéhyde à 2% dans le tampon cacodylate 0,1M pendant 3 heures à la température ambiante puis acide osmique à 2% dans le tampon cacodylate pendant 1 h à 0°. La pression osmotique est de 400 mosm, c'est-à-dire légèrement hyperosmotique par rapport à la pression osmotique de l'organe afin de compenser la dilution par l'eau des organes. Les explants sont ensuite déshydratés puis inclus dans l'Epon 812.



Des coupes ultra-fines sont recueillies sur des grilles nues, elles sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 1% dans l'eau puis au citrate de plomb selon REYNOLDS (1963).

La majeure partie des observations a été réalisée sur le microscope électronique HITACHI HU12.

CHAPITRE III

RESULTATS PERSONNELS

Le comportement de la peau maintenue en culture est évalué d'après l'aspect histologique des explants. Pour chaque série de culture, des fragments de peau témoin sont fixés avant la mise en culture, puis des explants sont fixés à intervalles réguliers, tous les 3 ou 4 jours, pour être examinés aux microscopes optique et électronique.

A. LA PEAU HUMAINE AVANT LA MISE EN CULTURE

1) Etude histologique

Au microscope optique, la peau apparaît constituée d'épiderme et de derme (Fig. a pl. 1).

L'épiderme comprend 5 couches (Fig. c pl. 1) :

- la couche basale ou *stratum germinativum* composée d'une seule assise de cellules cylindriques capables de se diviser ;
- la couche de cellules polyédriques ou *stratum spinosum* appelée aussi corps muqueux de Malpighi ;
- la couche granuleuse ou *stratum granulosum* composée de cellules aplaties dont le cytoplasme contient des grains de kératohyaline ;
- la couche transparente ou *stratum lucidum* constituée de cellules dont le noyau est indistinct ou absent et dont le cytoplasme contient de la kératohyaline ;
- la couche cornée ou *stratum corneum* composée de cellules claires, mortes, sans noyau et dont le cytoplasme est remplacé par de la kératine.

Dans le derme, on distingue habituellement :

- une couche superficielle : "couche papillaire" en contact avec la surface interne de l'épiderme ;
- une couche réticulaire plus profonde en contact

avec l'hypoderme sous-jacent.

L'épaisseur de l'épiderme et en particulier de la couche cornée varie avec la région du corps. Ainsi l'épiderme de la sole plantaire et de la paume des mains est très épais. Il est beaucoup plus mince sur les autres régions du corps.

Sur la planche 1 (Fig. a, b, c, d), n'apparaît pas de différence sensible de structure entre la peau du bras, du ventre et de la cuisse ; on note seulement quelques variations dans l'épaisseur de l'épiderme.

2) Ultrastructure

L'ultrastructure des différentes couches de la peau humaine adulte de la région du bras est présentée dans les planches 1 (fig. e), 2 et 3.

La couche cellulaire la plus profonde de l'épiderme appelée couche germinative assure le renouvellement des cellules épidermiques pendant toute la durée de la vie. Les cellules basales (Fig. a pl. 2) reposent sur une mince membrane basale qui les sépare du tissu conjonctif constituant le derme dans lequel sont visibles de nombreuses fibres de collagène et des fibroblastes (Fig. e pl. 1). Les cellules basales ont une forme allongée perpendiculairement à la membrane basale, leur noyau ovoïde renferme plusieurs nucléoles et une mince couche périphérique de chromatine. La particularité cytoplasmique la plus remarquable de ces cellules réside dans des faisceaux de tonofilaments formant des tonofibrilles, orientés perpendiculairement au plan de la jonction dermo-épidermique. Ces fibrilles qui sont des protéines de structure jouent le rôle de "cytosquelette". Parmi les faisceaux de tonofilaments, on trouve quelquefois des microtubules qui se confondent par leur aspect et leur disposition aux tonofilaments (RUPEC, 1974). Le cytoplasme basal

renferme aussi de nombreux ribosomes libres, quelques un seulement étant associés au réticulum endoplasmique peu développé. Les mitochondries sont un bon indice de l'âge (SHUKLA, 1972) : très nombreuses dans les cellules de personnes jeunes, elles se raréfient dans la peau plus âgée. Lysosomes, glycogène et inclusions lipidiques sont généralement absents ; les centrioles et l'appareil de golgi sont rares. La quantité des mélanosomes présents dans les kératinocytes varie suivant les types de peau. Ils sont peu nombreux dans la peau claire (pl. 2). Dans la peau pigmentée, ils sont plus abondants et forment au-dessus du noyau, un capuchon supranucléaire qui intervient probablement dans la protection du noyau contre les effets nocifs de l'irradiation ultraviolette. Ces cellules forment une assise continue dans laquelle elles sont reliées les unes aux autres par des desmosomes, dont la description détaillée a été donnée par ODLAND (1958).

La limite entre le derme et l'épiderme forme des indentations irrégulières et présente des hémidesmosomes le long de la membrane basale (KOMURA et OFUJI, 1972). Celle-ci est rattachée au derme par ses fibrilles d'ancrage et les fibres de collagène du derme superficiel bien visibles sur la Fig. b pl. 2.

Les cellules basales sont en contact avec les cellules de Malpighi (Fig. a pl. 2), dont elles diffèrent essentiellement par les tonofilaments. Ceux-ci sont plus nombreux dans les cellules de Malpighi, plus compacts, plus denses aux électrons et forment un réseau qui s'étend à travers le cytoplasme alors que dans les cellules basales, ils étaient orientés perpendiculairement à la membrane basale. On note aussi l'absence de centrioles dans les cellules de Malpighi, les autres organites cytoplasmiques étant semblables.

Les cellules de la couche supérieure de Malpighi et celles de la base de la couche granuleuse contiennent de petits granules arrondis ou ovales de 0,1 à 0,5 μm : les corps d'Odland ou "membrane coating granule". Ils sont distribués dans toute le cytoplasme mais tendent à se concentrer au voisinage de la membrane cellulaire à laquelle ils peuvent être rattachés de telle manière que leur contenu soit en contact avec l'espace intercellulaire.

La couche granuleuse est caractérisée par la présence de granules de kératohyaline importants et par la réduction des organites cytoplasmiques (pl. 3). Le noyau montre des signes de dégénérescence : indentations, perte de la granulation uniforme. Un caractère essentiel de la kératinisation est l'épaississement de la membrane plasmique, difficile à voir sur la pl. 3.

Le produit final de la différenciation épidermique est l'élément kératinisé du *stratum corneum* qui consiste en couches de cellules kératinisées aplaties ayant chacune 0,5 à 0,8 μm d'épaisseur et environ 30 μm de diamètre. Le nombre des couches varie avec la région du corps, sur l'abdomen, le bras, le dos, il est d'environ 15 à 20 couches. Sur la sole plantaire, il peut être de plusieurs centaines.

Le derme est un tissu conjonctif constitué d'une part par des fibres élastiques et collagènes, d'autre part par des cellules de plusieurs types : fibroblastes et macrophages en majeure partie, puis mastocytes et cellules d'origine sanguine. Les fibres collagènes sont reconnaissables grâce à leur périodicité. Au niveau de la membrane basale, elles sont organisées régulièrement comme le montre la Fig. b pl. 2. Elles sont synthétisées par les fibroblastes caractérisés par leur forme allongée, une membrane plasmique bien définie, une réticulum endoplasmique granuleux très développé.

Les critères de croissance des éléments dermiques sont plus difficiles à définir que pour l'épiderme.

Dans l'exposé des résultats expérimentaux, une plus large part sera faite à l'étude du comportement de l'épiderme, en particulier pour l'évolution de la jonction dermo-épidermique et pour les cellules basales au cours de leur maturation vers les couches supérieures.

Au cours de nos expériences, nous avons cultivé de la peau humaine provenant des différentes régions du corps. Les résultats étant comparables, nous présentons uniquement ceux obtenus avec la peau du bras sauf pour la peau de nouveau-né (peau du dos).

B. COMPORTEMENT DE LA PEAU HUMAINE ADULTE EN CULTURE ORGANOTYPIQUE

1) Sur le milieu de culture I

Pour les premiers essais, le milieu de culture n°1 a été utilisé. 112 explants ont été ainsi cultivés, dont 67 sur le milieu 1 modifié (voir tableau I). Après 5 jours de culture, le derme semble inaltéré (Fig. a et b pl. 5), tandis que l'épiderme commence à se cliver en 2 parties :

- la partie superficielle où apparaissent des signes de nécrose,
- la partie basale constituée d'une ou deux couches de cellules vivantes.

a) L'épiderme

Examen de coupes semi-fines : la partie inférieure de l'épiderme est représentée sur la Fig. b pl. 5. La

membrane basale a un aspect frangé. Les cellules basales sont allongées et disposées perpendiculairement à la membrane basale comme dans la peau témoin. Les noyaux de forme ovoïde possèdent un ou deux nucléoles et ont une chromatine régulièrement répartie. La couche de Malpighi est constituée de cellules qui se détachent des cellules sous-jacentes.

En observant cette zone au microscope électronique (Fig. d pl. 5), on voit que l'aspect frangé de la membrane basale correspond en fait à de très nombreux replis irréguliers de la jonction dermo-épidermique. On observe sur la membrane basale les hémidesmosomes à intervalles réguliers. Les cellules basales ressemblent à celles des témoins : les tonofibrilles forment des faisceaux orientés perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique. Dans le cytoplasme basal, on peut remarquer de nombreux ribosomes libres, du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Le noyau renferme un ou deux nucléoles et une chromatine normale. La couche de Malpighi est constituée de plusieurs assises de cellules parallèles entre elles. Les différentes assises semblent perdre le contact entre elles et se séparent, ainsi apparaît la zone de clivage. Cependant, dans ces cellules, les noyaux ont encore une chromatine normale. Dans le cytoplasme les différents organites : ribosomes, mitochondries, appareil de Golgi conservent leur aspect initial mais les tonofilaments perdent leur orientation. Au-dessus du plan de clivage, la partie superficielle de l'épiderme est constituée de cellules à noyaux pycnotiques. Après 12 jours de culture (Fig. c pl. 5), il reste encore quelques cellules basales vivantes tandis que les autres cellules se détachent et meurent.

b) *Le derme*

Il apparaît inaltéré comme en témoigne l'aspect des fibroblastes. Il semble donc que ce milieu convienne à la survie du derme et des cellules basales indifférenciées mais ceci n'est pas suffisant pour conserver l'évolution normale des cellules épidermiques.

Aussi différents essais ont été réalisés en faisant varier les facteurs suivants :

- concentration en acides aminés et vitamines du milieu de culture,
- stripping de la peau,
- suppression du jus d'embryon,
- addition de phytohémagglutinine,
- effet du sérum de veau inactivé,
- effet du pH.

La plupart des résultats obtenus sur ces divers milieux ont été résumés dans le tableau I qui met en évidence l'état des explants après 7 jours de culture.

2) *Etude comparée de l'influence de la concentration du milieu en acides aminés et vitamines*

On réalise des milieux de culture enrichis en acides aminés et vitamines en concentrant 4 fois, 7 fois ou 10 fois le milieu de Eagle.

a) *Aspect histologique (pl. 5)*

Après 7 jours de culture, les explants cultivés sur des milieux 4, 7 et 10 fois concentrés, conservent apparemment leurs structures histologiques : on ne remarque aucune désorganisation. A 14 jours et plus, l'épiderme conserve une structure sensiblement normale. Bien qu'il n'y ait pas de dégénérescence cellulaire évidente, on remarque pourtant un certain nombre d'altérations des kératinocytes : le noyau semble vidé de sa chromatine, les nucléoles disparaissent comme nous le montre la Fig. f comparée au témoin Fig. e pl. 5. Quelquefois, après 25 jours de culture, les noyaux sont encore bien conservés (Fig. g pl. 5). Les contours cellulaires sont moins nets : les affinités tinctoriales sont altérées. La couche granuleuse commence à s'amincir. On n'observe ni couche de kératohyaline, ni parakératose. Mais la couche cornée semble avoir épaissi. On note, par endroits, la présence de décollements dermo-épidermiques (Fig. f pl. 5). Au niveau du derme superficiel, on observe des granulations, des microgranules. Les cellules dermiques sont floues, mais les structures vasculaires restent bien conservées. Les fibres élastiques et de collagène paraissent normales malgré une affinité tinctoriale diminuée.

b) *Ultrastructure des cellules des explants*

Afin de vérifier plus précisément les signes de vitalité des cellules des explants cultivés sur BEM 7 fois concentré pendant 4 jours, des examens au microscope électronique ont été réalisés. Sur la Fig. a pl. 6, apparaît clairement le décollement dermo-épidermique. Les noyaux commencent à s'éclaircir, la membrane nucléaire a disparu et la chromatine se rassemble en quelques grains puis disparaît : il y a chromatolyse. Les nucléoles ont disparu également. Tous les kératinocytes sont très "chevelus" ; les tonofilaments très nombreux occupent presque toute la cellule et sont orientés perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique. Dans le cytoplasme basal, on voit aussi des ribosomes et des mélanosomes. Dans la couche de Malpighi, les noyaux ont le même aspect clair. A la partie supérieure de l'épiderme (fig. b pl. 6), les couches cellulaires sont aplaties et parallèles à la surface, les membranes cellulaires présentent encore des replis avec de nombreux desmosomes.

Ces différentes altérations sont également

observées sur des explants de peau humaine adulte cultivés sur milieu 4 fois concentré et après 7 jours de culture on remarque un décollement dermo-épidermique, des noyaux clairs - Dans la partie supérieure les membranes cellulaires se déplissent et les très nombreux desmosomes sont parallèles à la surface cutanée.

Cette persistance de la structure tissulaire malgré l'atteinte flagrante des noyaux représente peut-être une conséquence de la rigidité des membranes externes.

3) Influence des autres facteurs

a) Facteurs sans effets notables

Certains facteurs n'ont pas d'effets notables : stripping de la peau, suppression du jus d'embryon et addition de phytohémagglutinine (de *Phaseolus vulgaris*, Eurobio). D'après REAVEN et COX (1968), le stripping de la peau, c'est-à-dire l'enlèvement de la couche cornée par application répétée de scotch a pour effet de stimuler les mitoses. Un effet similaire est obtenu par SARKANY et coll. (1965) qui ajoute au milieu de culture la phytohémagglutinine à la dose de 0,1 ml Pha pour 2 ml de milieu, dose que nous avons nous-mêmes employée. Avec le milieu de culture I où le milieu de Eagle BEM est concentré, le stripping de la peau et l'addition de phytohémagglutinine n'ont pas d'effets notables sur l'activité mitotique des explants et ne donnent pas de meilleurs résultats comme le montre le tableau I. La suppression du jus d'embryon est sans effet sur la durée de survie.

b) Facteurs favorables à une meilleure survie

Ce sont l'inactivation du sérum, le maintien du pH à 7,4 - 7,6. L'utilisation d'un milieu composé uniquement de sérum humain frais a abouti à une nécrose rapide des 10 explants cultivés ainsi. Ce résultat peut être attribué au fait que le sérum n'était pas inactivé. L'utilisation de sérum de veau inactivé, par chauffage à 56°C pendant 30 minutes, donne de meilleurs résultats. Des explants cultivés sur milieu BEM enrichi de sérum de veau inactivé présentent après 7 jours de culture des kératinocytes vivants (la chromatine des noyaux est normale), malgré quelques décollements dermo-épidermiques et des noyaux pycnotiques à la partie supérieure de l'épiderme (Fig. d pl. 5).

Le pH joue un rôle important et l'emploi d'une atmosphère constituée de 95% air et 5% Co₂ a été un facteur favorisant la survie des explants.

C. CROISSANCE ET DIFFERENCIATION DE LA PEAU HUMAINE ADULTE ET DE NOUVEAU-NE IN VITRO

L'évolution, en fonction du temps, des explants de peau humaine adulte est représentée sur la planche 7, la culture ayant été réalisée à une température de 37°C à pH = 7,4 avec le milieu II, qui après plusieurs essais, s'est révélé le meilleur.

Les pourcentages de réussite sont résumés dans le tableau suivant en considérant que les explants ont évolué favorablement en culture si les tissus sont restés vivants.

	Nombre d'explants	Nombre de "bonnes cultures"	Pourcentage de réussite
Peau adulte	77	35	45 %
Peau adulte. Le sérum de veau foetal remplace le sérum de veau inactivé	44	10	23 %
Peau de nouveau-né	10	10	100 %
	131		

1) Etude de l'évolution en histologie normale

Après 3 jours de culture (Fig. b pl. 7), l'épiderme est bien conservé. Les kératinocytes sont en bon état. La chromatine est répartie régulièrement dans les noyaux qui possèdent un ou deux nucléoles. On note la présence de mitoses dans la couche basale. La couche de Malpighi est très épaissie comparativement au témoin (Fig. a) et on observe une hyperacanthose : prolifération des bourgeons dans le derme.

A 7 jours, les mitoses (indiquées par des flèches sur les Fig. c, d, pl. 7) sont plus nombreuses dans la couche basale qu'à 3 jours. Une nouvelle couche de kératohyaline s'est formée et au-dessus de celle-ci, on observe une couche de noyaux pycnotiques. La couche cornée s'est légèrement épaissie.

A 14 jours, toute la partie supérieure de l'épiderme est en voie de nécrose : les noyaux des cellules sont pycnotiques. Seules une ou deux couches de cellules à la base de l'épiderme restent vivantes. (Fig. e pl. 7).

De façon à mettre en évidence l'influence de l'âge du donneur, des explants de peau post-embryonnaire (enfant de 2 mois) ont aussi été cultivés sur le même milieu et observés sur coupes semi-fines. Après 4 jours de culture, l'épiderme est bien conservé, la couche cornée s'est épaissie. Après 7 jours de culture, les cellules de la partie inférieure de l'épiderme sont bien vivantes, la couche cornée s'est beaucoup épaissie et desquame ...

Après 19 jours, les cellules basales sont normales tandis que les autres couches de l'épiderme sont très aplaties. (Fig. f pl. 7).

Les explants se comportent de la même façon, qu'ils soient complètement immergés, placés sur le fond de la boîte de Pétri, ou en émergence sur une grille, ou flottant simplement à la surface du milieu.

2) Evolution de l'ultrastructure des explants

Les fragments de peau humaine adulte ont été observés au microscope électronique après 7 jours de culture.

a) *Les couches profondes de l'épiderme et la jonction dermo-épidermique* (pl. 8)

Les cellules basales sont plus aplaties que dans la peau normale. Les noyaux de forme ovoïde et allongée avec 1 ou 2 nucléoles sont orientés parallèlement à la jonction dermo-épidermique et non pas perpendiculairement comme dans les cellules basales témoins. Les nombreux faisceaux de tonofilaments sont également orientés parallèlement à la basale. Les membranes cytoplasmiques sont étroitement imbriquées et on note par endroits des dilatations formant les espaces intercellulaires habituels. Les cellules sont fréquemment reliées entre elles par des desmosomes. Le cytoplasme est

parsemé de mitochondries, d'un grand nombre de ribosomes libres, quelques un sont associés au réticulum endoplasmique. La jonction dermo-épidermique ressemble en tout point à celle du témoin. Les hémidesmosomes sont répartis régulièrement le long de la membrane basale et on peut observer ses fibrilles d'ancrage avec le derme ainsi que les fibres de collagène du derme superficiel.

b) *Les couches superficielles de l'épiderme* (pl. 9)

Dans la partie supérieure de la couche de Malpighi (Fig. a pl. 9), les cellules sont aplaties et les noyaux allongés sont parallèles à la surface. Leur chromatine est régulièrement répartie. Dans le cytoplasme nous retrouvons toujours les mêmes organites : ribosomes, mitochondries, appareil de Golgi, beaucoup de tonofilaments enchevêtrés. Puis viennent la couche granuleuse et les couches cornées (Fig. b et c pl. 9) où il n'y a plus de noyaux, mais seulement beaucoup de fibres.

La croissance des explants est manifeste pendant les dix premiers jours de culture. Durant cette période, on observe des mitoses dans la couche basale, La kératinisation de l'épiderme aboutissant à la formation de kératohyaline et de couche cornée, mais aucun phénomène d'épibolie n'apparaît.

TABLEAU I

Evolution de la peau humaine après 7 jours de culture sur le milieu n°1 modifié

MILIEUX DE CULTURE	nombre d'ex-plants	EPIDERME			DERME		
		Kératinocytes des couches basale et de Malpighi	c. granuleuse	c. cornée	Membrane basale jonction D.E.	cellules	fibres
BEM x 10 + jus d'embryon de poulet + sérum de poulain (ou cheval) peau non strippée	15	La chromatine se rassemble en grains, nucléoles disparaissent, cytoplasme : aspect granuleux	Amincissement plus de kh différenciation en kératine pas de parakératose	Faible augmentation de l'épaisseur	Décollements dermo-épidermiques, aspect frangé de la basale	Contours cellulaires flous noyaux clairs	Normales mais affinités tinctoriales diminuées
		<i>Fig. g pl. 5</i>					
BEM x 10 + jus d'embryon de poulet + sérum de poulain (ou cheval) peau strippée	10	Nucléoles et chromatine disparaissent, cytoplasme aspect granuleux	Granuleuse normale, pas de parakératose, peu de kh	Augmentation de l'épaisseur	Décollements dermo-épidermiques, aspect frangé de la basale	Contours cellulaires flous	Normales mais affinités tinctoriales diminuées
BEM x 4 + jus d'embryon de poulet + sérum de poulain (ou cheval) peau strippée	10	Noyaux éclaircis <i>Fig. a pl. 5</i> <i>Fig. a pl. 6</i>	pas de parakératose peu de kh	Augmentation de l'épaisseur	Décollements dermo-épidermiques, aspect frangé de la basale	Contours cellulaires flous	Affinités tinctoriales diminuées
BEM x 7 + jus d'embryon de poulet + sérum de poulain (ou cheval) peau strippée	10	Noyaux éclaircis <i>Fig. b pl. 5</i> <i>Fig. c pl. 5 (14 jours)</i>	pas de parakératose peu de kh	Augmentation de l'épaisseur	Décollements dermo-épidermiques, aspect frangé de la basale <i>Fig. a, b pl. 6 (3 jours)</i>	Contours cellulaires flous	Affinités tinctoriales diminuées
BEM x 7 + sérum de poulain (ou cheval)	12	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem
BEM N + sérum de veau inactivé		Chromatine normale, nucléoles présents, cytoplasme normal	cellules pycnotiques	Augmentation de l'épaisseur <i>Fig. d pl. 5</i>	Très légers décollements dermo-épidermiques	Normales	Normales

CHAPITRE IV

DISCUSSION – CONCLUSION

D'après les observations que nous avons faites, la discussion peut s'engager sur 2 points essentiels :

A. IMPORTANCE DES CONDITIONS DE CULTURE

Les conditions de culture ont une grande influence sur l'évolution de la structure des explants.

Les meilleurs résultats pour la conservation et la différenciation des cellules de la peau en culture sont obtenus avec le milieu II. Les autres méthodes n'ont abouti qu'à un maintien temporaire des structures histologiques. L'augmentation de la concentration (4 à 10 fois) en acides aminés et vitamines permet une bonne conservation des structures cytoplasmiques malgré l'atteinte évidente des noyaux.

L'influence du nombre et du volume des explants par boîte n'a pas été étudiée de façon systématique, mais dans chaque série réalisée, aucune différence n'a été remarquée dans la survie des explants, qu'ils soient cultivés seuls ou en présence d'un ou deux autres fragments.

Les conditions de culture pourront influencer également le devenir des greffes ultérieures. Récemment, SIDDQUI et coll. (1974) affirment que la peau de souris après 8 semaines de culture en milieu liquide est trop "molle" pour la greffe bien qu'histologiquement vivante et un milieu solide serait plus favorable. De nouvelles expériences doivent être entreprises en tenant compte de ces résultats et de ceux d'autres chercheurs qui essaient de perfectionner les techniques. Parmi les méthodes présentées récemment, celle de BOYD (1971) qui utilise une nouvelle chambre pour la culture organotypique de grands volumes de tissu (2 à 4 fragments de 3 à 5 mm³ par boîte) et qui a un intérêt pour certaines recherches telles que les études d'échanges gazeux, celle de ANSEVIN et LIPPS (1973) qui cultivent des agrégats de cellules pendant plusieurs semaines, nous semblent particulièrement intéressantes pour préparer des explants

destinés à des greffes ultérieures après culture en présence de substances capables de modifier les propriétés de surface des cellules.

B. CRITERES DE CROISSANCE ET DE DIFFERENCIATION

Si l'on se réfère aux critères définis par SARKANY et coll. (1965), la peau humaine adulte ou post-embryonnaire cultivée selon la deuxième méthode montre des signes manifestes de croissance et de différenciation cellulaire pendant 10 jours, ce qui correspond à la durée obtenue par SARKANY lui-même. Les critères de croissance de la peau en culture organotypique retenus sont les suivants :

- Epibolie : l'épiderme migre à partir du bord de l'explant et recouvre le derme.
- Apparition d'une nouvelle couche cornée composée principalement de cellules parakératotiques.
- Présence de mitoses dans la couche basale.
- Maintien de la structure générale de la peau.

D'autres auteurs ont également défini des critères de croissance ; ils sont voisins des précédents. Ainsi pour LEVINE (1972), les critères de croissance et de différenciation épidermique sont l'apparence en "bonne santé", la capacité pour les cellules basales de synthétiser l'ADN, l'organisation stratifiée de l'épiderme et le développement d'une couche cornée.

Si nous reprenons ces différents points pour les commenter avec plus de précision et les comparons avec nos résultats, nous constatons que :

- a) Le phénomène d'épibolie décrit par divers auteurs et considéré par eux comme critère indiscutable de croissance n'a pas été observé dans nos cultures. Comme le pense SARKANY (communication personnelle), cela est dû à une teneur insuffisante du milieu en sérum. En effet, LEVINE (1972) observe seulement l'épibolie dans les explants cultivés en présence de hautes

concentrations en sérum. Ce phénomène s'explique par le rôle que joue le sérum ; en inhibant les collagénases le sérum permet l'adhésion des cellules épidermiques sur le derme, nécessaire à la migration cellulaire. Cependant, FIRKET et IVERSEN (1964) affirment que l'explant de peau de souris adulte en culture organotypique (milieu 199 et sérum de veau) ne se comporte pas comme une peau en régénération, mais comme une peau normale : il n'y a pas augmentation des divisions cellulaires et pas de migration de cellules. Pour MARKS et coll. (1972), le mouvement de migration des cellules autour de l'explant est indépendant de l'activité mitotique. C'est un mouvement épidermique actif différent de la division cellulaire.

b) D'autre part, dans les explants de peau humaine adulte après 7 jours de culture (pl. 7) on observe la formation d'une nouvelle couche cornée, et de kératohyaline : on a donc orthokératose, prolifération verticale et non pas parakératose, comme l'ont montré certains auteurs. En particulier, OKOMURA (1967) conclut que le phénomène de kératinisation de la peau humaine *in vitro* ne ressemble pas à celui d'un épiderme parakératotique *in vivo*. LEVINE (1972) montre que ses explants après 5 jours de culture, présentent sous la couche cornée, une couche parakératotique comprenant de nombreux noyaux pycnotiques, ce qui ressemble aux résultats obtenus pl. 7 et pl. 5.

c) Les mitoses observées dans les explants après 4 jours ou après 7 jours de culture (pl. 7) se sont bien déroulées en culture puisque la durée du cycle cellulaire dans l'épiderme humain *in vitro* est de 59 h, soit 2 jours 1/2 d'après CHOPRA et FLAXMAN (1972). Après avoir bloqué les mitoses en métaphase par la vinblastine sulfate, REAVEN et COX (1968) montrent que l'activité mitotique passe par un maximum entre le 2ème et le 4ème jour, ce phénomène est dû, semble-t-il à la stimulation produite par l'enlèvement de la couche cornée. Mais la présence de sérum dans le milieu de culture n'est pas nécessaire. Certaines de nos séries de culture pré-

sentent un grand nombre de mitoses dans les explants cultivés 7 jours, alors qu'aucune mitose n'est trouvée dans les témoins correspondants. La croissance n'est-elle pas stimulée par un facteur inconnu ? Généralement, dans les cultures comme dans les témoins, on voit rarement les mitoses lorsqu'elles ne sont pas bloquées par la colchicine ou la vinblastine sulfate. On sait que l'activité mitotique des explants varie au cours d'une journée. Lors d'une série de culture, les explants ont été fixés toutes les 4 heures pendant 24 heures, mais n'ont pas donné de résultats concluants. D'après nos observations, les explants de peau post-embryonnaire offrent un pourcentage plus élevé de bonne conservation. En culture, la peau embryonnaire continue à croître et à se différencier.

d) Enfin, dans tous les explants, on observe le maintien de la structure générale de la peau et son organisation en strates. Cependant, dans les explants cultivés en présence de concentrations élevées d'acides aminés et vitamines et à un pH supérieur à 7,6, on observe des décollements dermo-épidermiques se produisant au-dessus de la basale (pl. 6). Ils résultent de la suppression de la connexion entre les cellules basales et la membrane basale avec séparation le long de l'espace intermembranaire. HAMBRICK et HANDWERGER (1969) ont observés en particulier dans les explants de peau psoriasique après 1 jour de culture, une nécrose de la majeure partie de l'épiderme, les lignes de séparation étant au-dessus de la couche basale et au niveau de la membrane basale. Seules quelques cellules basales vivantes permettent la survie des explants.

Les cultures organotypiques de peau constituent donc un modèle expérimental précieux en permettant de reproduire *in vitro* des expériences difficiles à réaliser chez l'homme. Elles ouvrent de nouvelles voies expérimentales, mais on doit reconnaître leurs limites. L'explant est conservé dans son intégrité et sa complexité ; les cellules gardent leur caractère épidermique et évoluent vers la kératinisation mais la croissance prolongée est encore difficile.

BIBLIOGRAPHIE

- AGACHE P., MAZZUCA M. (1970). - Observations sur l'ultra-structure des kératinocytes de la peau plantaire humaine. *Ann. Dermatol. Syphiligr.*, **97**, 557-566.
- ANSEVIN K.D., LIPPS B.V. (1973). - Tissue-plate : a new technique for long-term organotypic culture. *In Vitro*, **8**, 483-488.
- ARGYRIS T.S. (1972). - Chalone and the control of normal regenerative and neoplastic growth of the skin. *Amer. Zoologist*, **12**, 137-150.
- BARNETT M.L., SZABO G. (1973). - Effect of vitamin A on epithelial morphogenesis *in vitro*. Fine structural changes in explants of adult mammalian skin. *Exper. Cell Res.*, **76**, 118-126.
- BASSET F. (1971). - Problèmes posés par les cellules de Langerhans. *Soc. fr. Dermatol. Syphiligr.*, **78**, 130-137.
- BAUER F.W., KUYPER C.M.A. (1972). - Differentiation and keratinization of fetal rat skin. I. Light microscope study on skin cultured *in vitro*. *Dermatologica*, **44**, 332-347.
- BAUER F.W. (1972). - Differentiation and keratinization of fetal rat skin. II. Ultrastructural study of the epidermis *in vivo* and *in vitro*. *Dermatologica*, **145**, 16-36.
- BERNSTEIN I.A. (1970). - Chemical differentiation in the epidermis. *J. Soc. Cosmet. Chemists*, **21**, 583-594.
- BIETRY A., GOMOT L., LAURENT R., AGACHE P. (1973). - Quelques problèmes posés par la culture organotypique de peau humaine adulte. *Ann. Dermatol. Syphiligr.*, **100**, 519-523.
- BILLINGHAM R.E., SILVERS W.K. (1963 a). - Origin and conservation of epidermal specificities. *N. Engl. J. Med.*, **268**, 477-480, 539-545.
- BILLINGHAM R.E., SILVERS W.K. (1963 b). - Further studies on the phenomenon of pigment spread in guinea pigs'skin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **100**, 348-360.
- BILLINGHAM R.E., SILVERS W.K. (1967). - Studies on the conservation of epidermal specificities of skin and certain mucosas in adult mammals. *J. exper. Med.*, **125**, 429-446.
- BILLINGHAM R.E., SILVERS W.K. (1973). - Transplantation and cutaneous genetics. *J. invest. Dermatol.*, **60**, 509-515.
- BISHOP S.C., COX A.J., (1974). - Autoradiographic study of the DNA synthetic activity in human skin cultured *in vitro*. Effects of stripping and inhibition by glucosamine. *J. invest. Dermatol.*, **62**, 74-79.
- BOYD W.H. (1971). - A chamber for organotypic culture, adapted for growing large volumes of tissue. *Stain Technol.*, **46**, 85-87.
- DE LA BRASSINNE M., LACHAPPELLE J.M. (1972). - Etude autoradiographique de l'incorporation *in vitro* de thymidine 6^{3H} dans l'épiderme humain. *Bull. Soc. fr. Dermatol. Syphiligr.*, **79**, 140-142.
- BREATHNACH A.S. (1970). - An atlas of the ultrastructure of human skin. Development, differentiation and post-natal features. J. & A. Churchill Ed., London, 397 p.
- BREATHNACH A.S. (1971). - Embryology of human skin. A review of ultrastructural studies. *J. invest. Dermatol.*, **57**, 133-143.
- BREATHNACH A.S. (1972). - Ultrastructure of foetal and post natal human skin as revealed by the freeze fracture replication technique. *Micron*, **3**, 278-304.
- BRIGGAMAN R.A., CLAYTONE E., WHEELER Jr. (1968). - Epidermal dermal interactions in adult human skin. I. Role of dermis in epidermal maintenance. *J. invest. Dermatol.*, **51**, 454-465.
- BRIGGAMAN R.A., CLAYTONE E., WHEELER Jr. (1971). - Epidermal dermal interactions in adult human skin. II. Nature of dermal influence. *J. invest. Dermatol.*, **56**, 18-26.

- BULLOUGH W.S., LAURENCE E.B., IVERSON O.H. (1967). - The vertebrate epidermal chalone. *Nature*, **214**, 578.
- BULLOUGH W.S. (1972). - The control of epidermal thickness. *Brit. J. Dermatol.*, **87**, 187-199, 347-354.
- CARR R.H., BUSSE W.W., REED C.E. (1973). - Failure of catecholamines to inhibit epidermal mitosis *in vitro*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **51**, 255-262.
- CARREL A., BURROWS M.T. (1911). - Cultivation of tissues and its technic. *J. exper. Med.*, **13**, 387-396.
- CARREL A. (1912). - The preservation of tissues and its applications in surgery. *J. Amer. Med. Assoc.*, **59**, 523-527.
- CARON G.A. (1968). - Organ culture of normal and psoriatic skin. *Arch. Dermatol.*, **97**, 575-586.
- CHANG L.W., MAIBACH H.I. (1967). - Foetal pig skin in organ culture in dermatological investigation. *J. invest. Dermatol.*, **49**, 486-496.
- CHOPRA D.P., FLAXMAN B.A. (1972). - Human epidermal cell cycle *in vitro*. *Brit. J. Dermatol.*, **87**, 13-17.
- CORMACK M.C., ROBERT M. (1957). - Viability studies of human skin grafts as determined by tissue culture methods. *Plast. Reconstr. Surg.*, **19**, 483.
- CRUICKSHANK C.N.D. (1954). - Continuous observation of the respiration of skin *in vitro*. *Ibid.*, **7**, 374.
- DELESCLUSE C., PRUNIERAS M., COLSON P. (1970). - Incorporation de thymidine tritiée dans la peau humaine normale. *Ann. Dermatol. Syphiligr.*, **97**, 509-572.
- EAGLE H. (1955). - Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, **122**, 501-504.
- EAGLE H. (1959). - Amino-acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130**, 432-437.
- ELGJO K., (1972). - Chalone inhibition of cellular proliferation. *J. invest. Dermatol.*, **59**, 81-83.
- ELGJO K., LAERUM O.D., EDGEHILL W. (1972). - Growth regulation in mouse epidermis. II. G_1 -inhibitor present in the differentiating cell layer. *Virchows Arch. Abt. B Zellpathol.*, **10**, 229-236.
- ELGJO K., EDGEHILL W. (1973). - Epidermal growth inhibitions (chalones) in dermis and serum. *Cell. Path.*, **13**, 14-23.
- FIRKET H., IVERSEN O.H. (1964). - Culture organotypique de larges fragments de peau de souris adultes. Comportement de l'épiderme. Coll. Intern. C.N.R.S. n°145, 47-51.
- FRIEDMANN-KIEN, MORRIL S., PROSE P.H., LIEBHABER H. (1966). - Culture of adult human skin : *in vitro* growth and keratinization of epidermal cells. *Nature*, **213**, 1583-1584.
- GELFANT S., CANDELAS G.C. (1972). - Regulation of epidermal mitosis. *J. invest. Dermatol.*, **59**, 7-12.
- GOWAN Mc T.R., BANG F.B. (1960). - Organ cultures of human foetal skin for the study of skin diseases. *Bull. Hopkins Hosp.*, **107**, 63.
- HAMBRICK G.W., STANFORD J.B., LAMBERG I., BLOOMBERG R.N. (1966). - Observations on keratinization of human skin *in vitro*. *J. invest. Dermatol.*, **47**, 541-550.
- HAMBRICK G.W., HANDWERGER R.L. (1969). - The behavior of explants of psoriasis *in vitro*. *J. invest. Dermatol.*, **52**, 126-135.
- HEENEN M., GALANP P. (1971). - Cell population kinetics in human epidermis : *in vitro* autoradiographic study double labeling method. *J. invest. Dermatol.*, **56**, 425-429.
- KARASEK M.A. (1967). - *In vitro* culture of human skin epithelial cells. *J. invest. Dermatol.*, **47**, 533-539.
- KARASEK M.A., CHARLTON M.E. (1971). - Growth of post-embryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J. invest. Dermatol.*, **56**, 205-210.
- KARATSCHAI M., KINZEL V., GOERTTLER K., SUSS R. (1971). - "Geography" of mitoses and cell divisions in the basal cell layer of mouse epidermis. *Z. Krebsforsch.*, **76**, 59-64.
- KOMURA J., OFUJI S. (1972). - Ultrastructure of half desmosomes fixed only in glutaraldehyde. *Dermatologica*, **144**, 35-39.
- KRAWCZYK W.S. (1971). - A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J. Cell. Biol.*, **49**, 247-263.

- KRAWCZYK W.S., WILGRAM G.F. (1973). - Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J. Ultrastruct. Res.*, **45**, 93-101.
- LASNITSKI (1964). - Tissue culture of skin. In "Progress in the biological sciences in relation to Dermatology" Rook A. et Champion RH, Cambridge, 483-493.
- LAURENCE E.B., RANDERS-HANSEN E., CHRISTOPHERS E., RYTOMAA T. (1972). - Systemic factors influencing epidermal mitosis. *Rev. Eur. Et. clin. biol.*, **17**, 133-138.
- LEVINE M. (1972). - The growth of adult human skin *in vitro*. *Brit. J. Dermatol.*, **86**, 481-490.
- MANN P.R. (1962). - Effects of various substances on DNA synthesis in guinea pig skin *in vitro*. *Nature*, **216**, 715.
- MARKS R., BHOGAL B., DAWBER R.P.R. (1972). - The migratory property of epidermis *in vitro*. *Arch. Dermatol. Res.*, **243**, 209-220.
- MARKS R., NISHIKAWA T. (1973). - Active epidermal movement in human skin *in vitro*. *Brit. J. Dermatol.*, **88**, 245-248.
- MATSUNAKA M., MISHIMA Y. (1969). - Electron microscopy of embryonic human epidermis at seven and ten weeks. *Acta Dermato-venereol.*, **49**, 241-250.
- MAZZUCA M., AGACHE P. (1970). - Structure fine de l'épiderme plantaire humain. *J. Micros.*, **9**, 75-88.
- MONTAGNA W., LOBITZ W.C. (1964). - The epidermis. Academic Press York, 61-81.
- NISHIKAWA T., MARKS R. (1973). - Effect of cytochalasin B on epidermal cell migration *in vitro*. *Brit. J. Dermatol.*, **88**, 469-474.
- ODLAND G.F. (1958). - The fine structure of the interrelationships of cells in the human epidermis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 529-538.
- OKOMURA K. (1967). - Further studies on the epidermal keratinization of human skin by organ culture. *Jap. J. Dermatol.*, **77**, 377-379.
- PARAKKAL P.F., ALEXANDER N.J. (1972). - Keratinization. A survey of vertebrate epithelia. Academic Press, 34-58.
- PORTER K.R., BONNEVILLE M.A. (1969). - Structure fine des cellules et des tissus. *Ediscience*, 35-39.
- PROSE P.H., FRIEDMAN KIEN A.E., NEISTEIN S. (1967). - Ultrastructural studies of organ cultures of adult human skin. *Lab. Invest.*, **17**, 693-716.
- PRUNIERAS M. (1965). - La culture de l'épiderme. S.P.E.I. Ed., Paris IXe, 141 p.
- PRUNIERAS M. (1968). - Interactions entre les cellules de l'épiderme. *Rev. fr. Et. clin. biol.*, **13**, 743-746.
- PRUNIERAS M. (1971). - Physiologie du mélanocyte de la peau de mammifère. *Soc. fr. Dermatol. Syphiligr.*, **78**, 129-130.
- PULLAR P., LIADSKY C. (1965). - Enzyme histochemistry of developing human skin in tissue culture. *J.R. Micr. Soc.*, **84**, 317-322.
- REAMS W.M., TOMPKINS S.P. (1973). - A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. *Develop. Biol.*, **31**, 114-123.
- REAVEN E.P., COX A.J. (1965). - Organ culture of human skin. *J. invest. Dermatol.*, **44**, 151-156.
- REAVEN E.P., COX A.J. (1968). - Behavior of adult human skin in organ culture. II. Effects of cellophane tape stripping, t^o, O₂, tension, pH and serum. *J. invest. Dermatol.*, **50**, 118-128.
- REYNOLDS E.S. (1963). - The use lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**, 208-212.
- ROWE L., DIXON W.J. (1972). - Clustering and control of mitotic activity in human epidermis. *J. invest. Dermatol.*, **58**, 16-23.
- RUDOLPH R., KLEIN L. (1973). - Healing processes in skin grafts. *Surgery*, **136**, 641-654.
- RUPEC H. (1974). - The Microtubuli der Keratinocyten normaler menschlicher Epidermis. *Arch. Dermatol. Forsch.*, **249**, 235-246.
- SARKANY I., GRICE K., CARON G.A. (1965). - Organ culture of adult human skin. *Brit. J. Dermatol.*, **77**, 65-76.

- SARKANY I., CARON G.A. (1965). - Phytohaemagglutinin induced mitotic stimulation of epithelial cells in organ culture of adult human skin. *Brit. J. Dermatol.*, **77**, 439.
- SARKANY I., KITANO Y. (1970). - Ultrastructural changes in human skin maintained in organ culture. *Brit. J. Dermatol.*, **83**, 572-581.
- SARKANY I. (1972). - Organ culture of human skin. In "Modern Trends in Dermatology - 4". Borrie P., London, 53-68.
- SIDDIQUI A.H., JANSSEN DE LIMPENS A.M.P., CORMANE R.H. (1974). - In vitro organ culture of adult human and mouse skin. *Acta Dermatovener.*, **54**, 255-258.
- SCHELLANDER F., MARKS R. (1973). - Thymidine uptake by high level epidermal cells. *Acta Dermato-venereol.*, **53**, 31-34.
- SHUKLA R.C. (1972). - Visualization of mitochondria in the isolated dendritic cells and the keratinocytes of the epidermis of the white guinea pig and of the human beings under the light microscope. Preliminary report. *Indian J. Med. Res.*, **60**, 1411-1413.
- SUMMERLIN W.T., CHARLTON E., KARASEK M. (1970). - Transplantation of organ cultures of adult human skin. *J. invest. Dermatol.*, **55**, 310-316.
- SUMMERLIN W.T., CHARLTON E., KARASEK M. (1971). - Transplantation of organ cultures of adult human skin. *Jb. Dermatol.*, 52-54.
- SUMMERLIN W.T., BROUTHAR C., FOANES R., PAYNE R., STUTMAN O., HAYFLICK L., GOOD R.A. (1973). - Acceptance of phenotypically differing cultured skin in man and mice. *Transplant. Proc.*, **5**, 707-710.
- SUMMERLIN W.T. (1973). - Allogenic transplantation of organ cultures of adult human skin. *Clin. Immunol. and Immunopathol.*, **1**, 372-384.
- SUMMERLIN W.T. (1973). - Alteration of Immunogenicity in organ culture. In "Différenciation des cellules eucaryotes en culture", Coll. Intern. I.N.S.E.R.M., Paris, 18-23 juin 1973, 239-244.
- TROWELL O.A. (1959). - The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exper. Cell. Res.*, **16**, 118.
- VOORHEES J.J., DUELL E.A., BASS L.J., HARRELL E.R. (1973). - Role of cyclic AMP in the control of epidermal cell growth and differentiation. *Nat. Canc. Inst. Mon.*, **38**, 47-59.
- WILLMER E.N. (1966). - Celles and tissues in culture. Methods, Biology and Physiology. Academic Press., Vol. 2 809 p., Vol. 3 826 p.
- WINKELMANN R.K. (1973). - The merkel cell. *J. invest. Dermatol.*, **60**, 2-15.
- WOLFF E., HAFFEN K. (1952). - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas. Rep. Biol. Med.*, **10**, 463-472.
- WOLFF E. (1956). - Les facteurs de la croissance et de la différenciation des organes embryonnaires en culture *in vitro*. In "Les facteurs de la croissance cellulaire", J.A. Thomas, Masson et Cie Ed., Paris, 157-188.
- ZELICKSON A.S. (1967). - Ultrastructure of normal and abnormal skin. Lea & Febiger Ed., Philadelphia, 431 p.

ORGAN CULTURES OF HUMAN SKIN : ULTRASTRUCTURAL STUDY

Summary

Organ cultures of adult human skin have been developed in order to ascertain the following hypothesis that skin fragments maintained in organ culture, then grafted, are accepted by an individual other than the donor.

This work involved finding the most favorable conditions to permit not only the conservation of histological structures, but also a growth and a differentiation of explants maintained in organ culture.

After several attempts with different methods and mediums, the best conditions assured the growth of explants for ten days. During this time, the appearance of mitotic figures in the basal layer, the keratinization of the epidermis resulting in the formation of keratohyalin and a new horny layer were noted, but no epipolic phenomenon.

Résumé

Des cultures de peau humaine adulte ont été réalisées afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle des fragments de peau maintenus en culture organotypique puis greffés seraient acceptés par un autre individu que le donneur.

Ce travail consistait donc à rechercher les conditions les plus favorables pour permettre non seulement une conservation des structures histologiques, mais aussi une croissance et une différenciation des explants maintenus en culture organotypique. Après plusieurs essais de diverses méthodes et de divers milieux, les meilleures conditions réalisées ont permis d'obtenir une croissance des explants pendant 10 jours. Durant cette période, on observe l'apparition de mitoses dans la couche basale, la kératinisation de l'épiderme se terminant par la formation de kératohyaline et de couche cornée mais aucun phénomène d'épibolie n'apparaît.

PLANCHE I

*Aspect histologique de la peau humaine adulte
de plusieurs régions du corps humain
avant la mise en culture
et Ultrastructure du derme.*

Figure a : Peau du bras (Homme) (x 375).

Figure b : Peau de la cuisse (femme) (x 375).

Figure c : Peau du bras (homme). (x 936).

Figure d : Peau du ventre (Homme). (x 936).

Figure e : Fibroblaste du derme entouré de collagène. (x 10 500).

c : collagène

cb : couche basale ; cm : couche de Malpighi ; cg : couche granuleuse, cc : couche cornée ; D : derme ; E : épiderme ; kh : kératohyaline ; N : noyau ; re : réticulum endoplasmique.

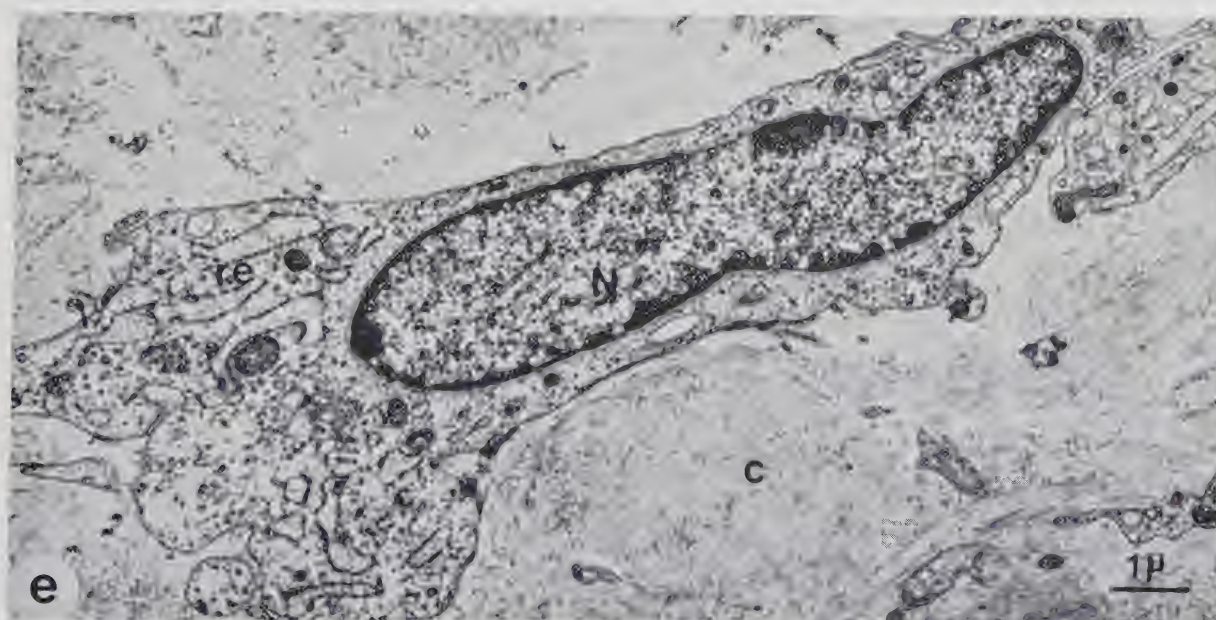
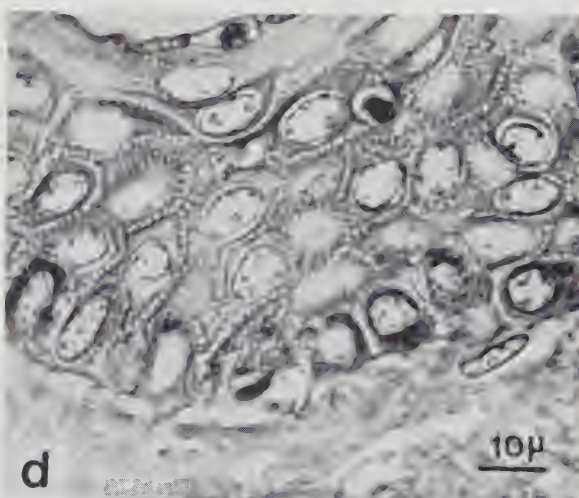
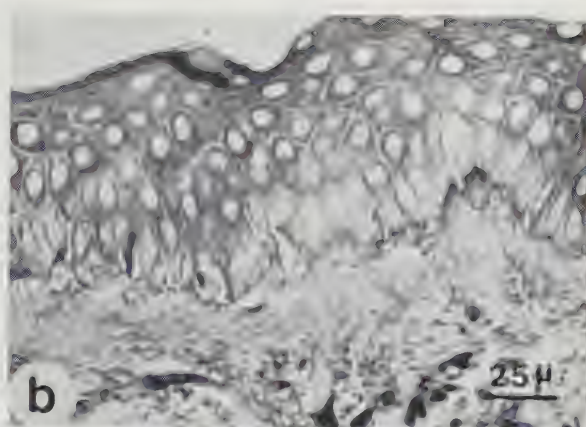
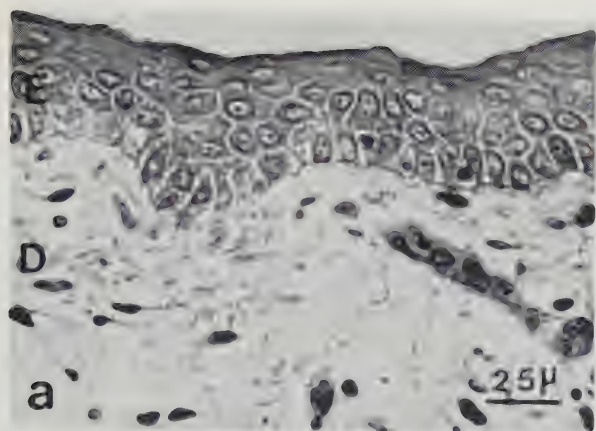


PLANCHE 2

*Ultrastructure de la peau humaine adulte du bras.
L'épiderme basal.*

Figure a : Cellules germinatives et première assise de cellules de la couche de Malpighi.

Noter l'abondance des évaginations cytoplasmiques dans le derme et entre les cellules.

Les cellules sont jointives et reliées entre elles par des desmosomes.

Le noyau de ces cellules est arrondi ou ovale, orienté perpendiculairement à la membrane basale. (x 12 000).

Figure b : Jonction dermo-épidermique avec ses fibrilles d'ancrage et les fibres de collagène du derme superficiel, régulièrement disposées. Noter la présence de nombreux hémidesmosomes le long de la membrane basale (x 37 500).

D : derme ; d : desmosome, f : tonofilaments ; hd : hémidesmosome ; m : mitochondrie ; mb : membrane basale ; mé : mélanosomes ; N : noyau ; n : nucléole ; re : réticulum endoplasmique ; vg : vésicules golgiennes.

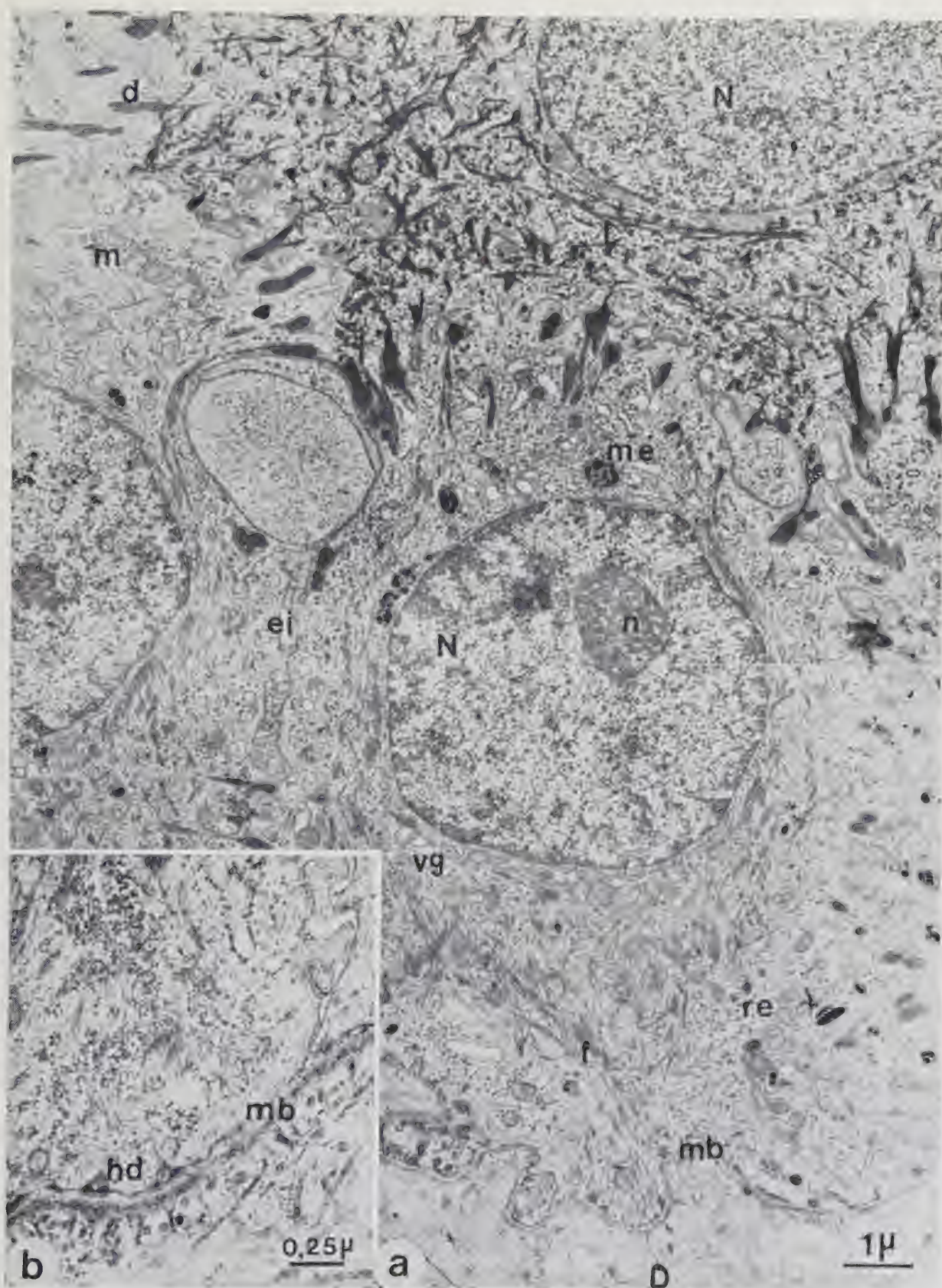


PLANCHE 3

Les couches superficielles de l'épiderme.

Figure a : Couche granuleuse et couche cornée. Les cellules sont aplaties, parallèles à la surface, caractérisées par la présence de flaques de kératohyaline autour du noyau. Sur cette figure, on passe brusquement d'une cellule granuleuse typique à une cellule sans noyau, complètement kératinisée. (x 10 800).

cc : couche cornée ; cg : cellule granuleuse ; ck : cellule kératinisée ; d : desmosome ; f : tonofilaments ; kh : kératohyaline ; N : noyau ; n : nucléole.



PLANCHE 4

*Evolution in vitro de la peau humaine
adulte du bras cultivée sur milieu n°1.*

Figure a : Dès le 5ème jour de culture, on note un clivage de l'épiderme en 2 parties. (x 375).

Figure b : La coupe précédente observée à un plus fort grossissement nous montre les cellules basales et l'aspect frangé de la jonction dermo-épidermique (flèche) (semi-fine colorée au bleu de toluidine). (x 936).

Figure c : Après 12 jours de culture, on assiste à la nécrose complète des cellules de l'épiderme et à un décollement dermo-épidermique. (x 375).

Figure d : Vue au microscope électronique de la figure b. (x 7 500).

cb : couche basale ; cm : couche de Malpighi ; cs : couches superficielles ; D : derme ; ei : espace intercellulaire ; mb : membrane basale ; N : noyau ; n : nucléole.

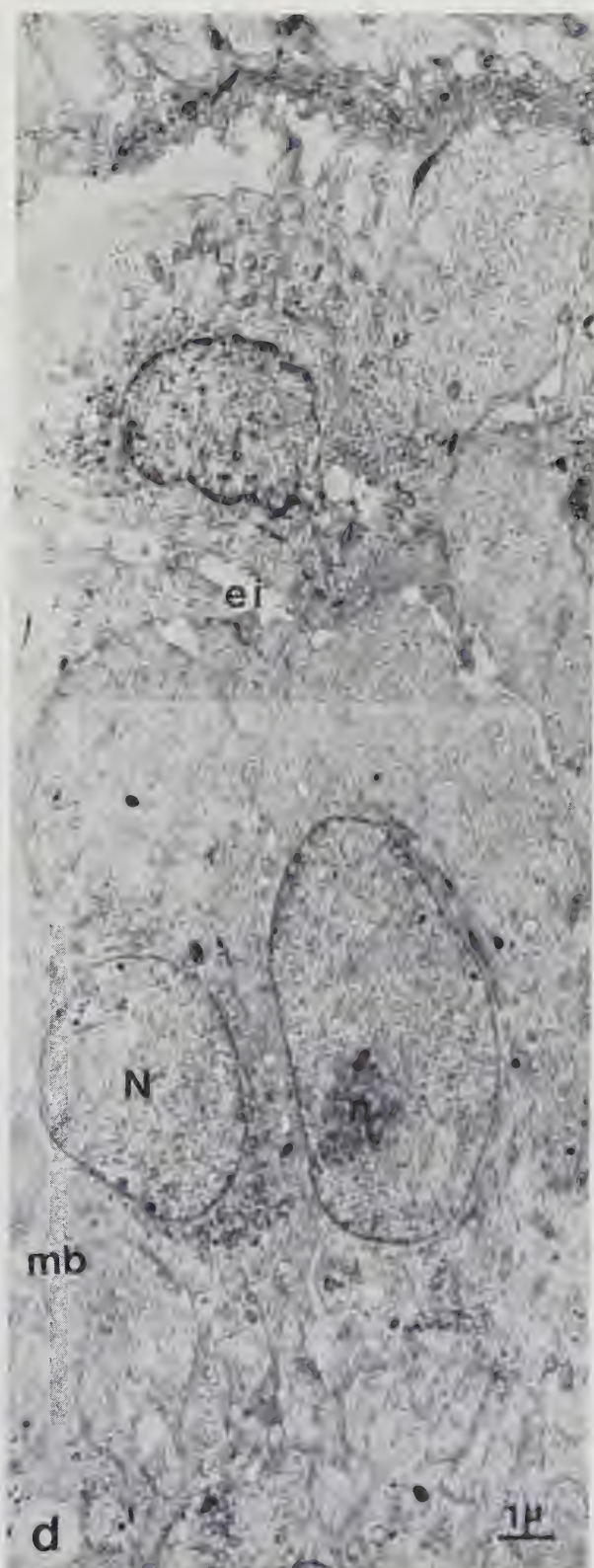
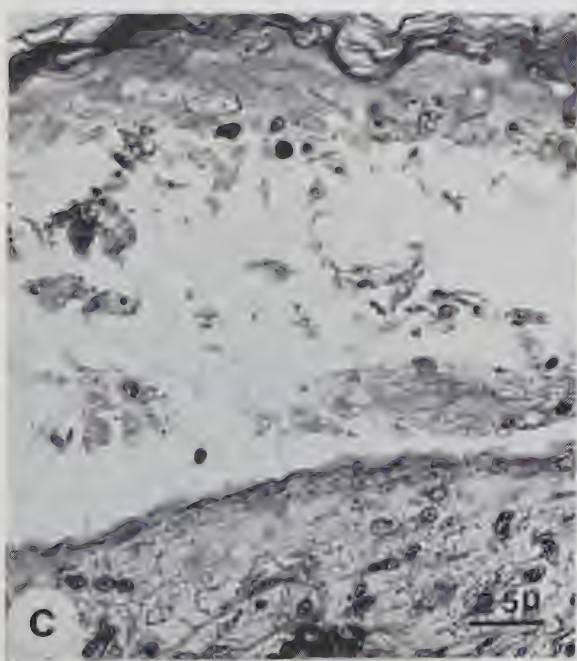
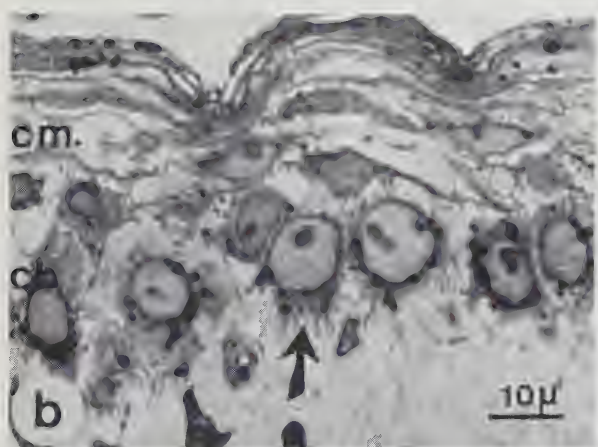
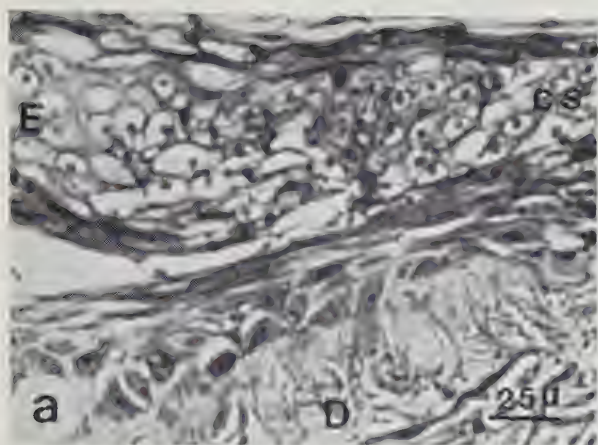


PLANCHE 5

*Peau humaine adulte du bras cultivée sur
un milieu de Eagle BEM concentré ou
enrichi de sérum de veau inactivé.*

Figure a : Après 5 jours de culture sur un milieu BEM 4 fois concentré, l'explant conserve l'organisation générale de la peau. (x 300).

Figure b : Mêmes observations pour cet explant cultivé pendant 7 jours sur un milieu 7 fois concentré. (x 300).

Figure c : Explant cultivé pendant 7 jours sur un milieu BEM+ sérum de veau inactivé. Les cellules sont en bon état. Noter la présence de décollements dermo-épidermiques. (x 375).

Figure d : Explant cultivé pendant 14 jours sur un milieu 7 fois concentré. Les noyaux apparaissent clairs. (x 300).

Figure e : Fragment de peau témoin à l'explantation. (x 936).

Figure f : Coupe faite dans un explant cultivé pendant 14 jours sur un milieu 7 fois concentré. Comparer avec la photo précédente. Les noyaux sont vidés de leur chromatine. Présence de décollements dermo-épidermiques (flèche). (x 936).

Figure g : Noyaux quelquefois en bon état après 15 jours de culture sur un milieu 10 fois concentré. (x 936).

D : derme ; E : épiderme.

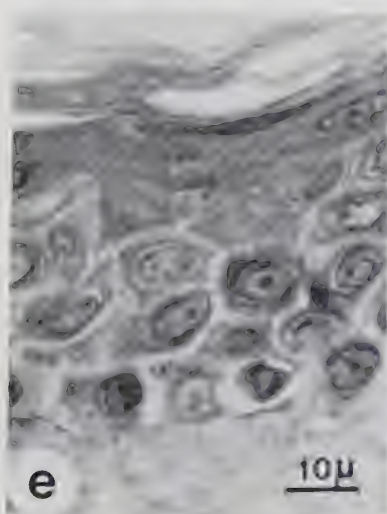
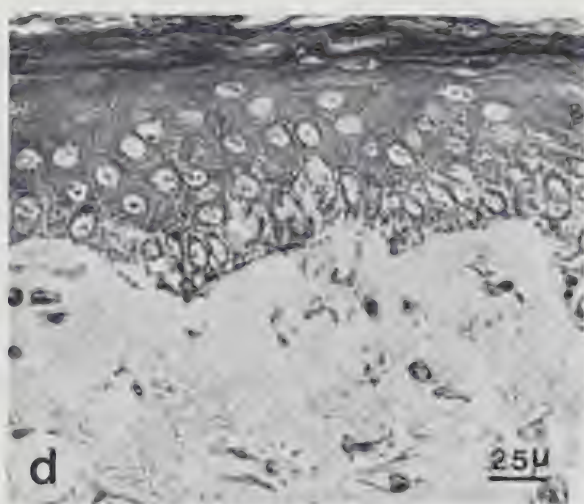
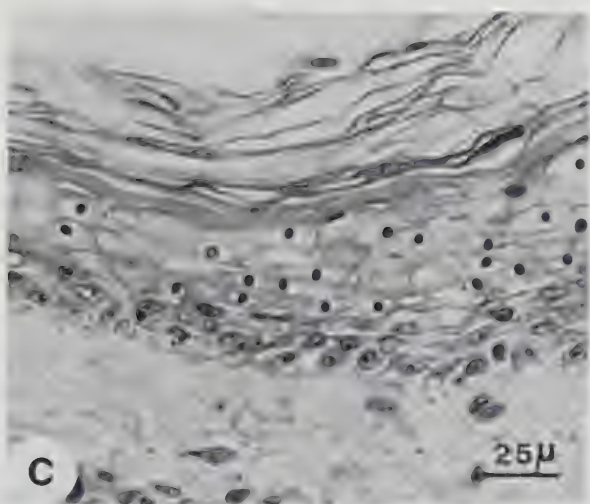
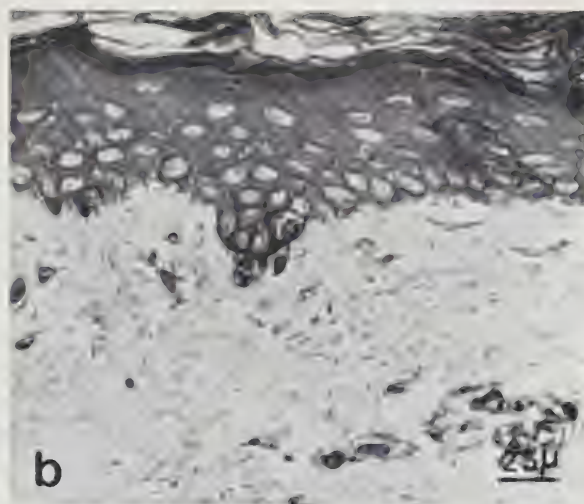
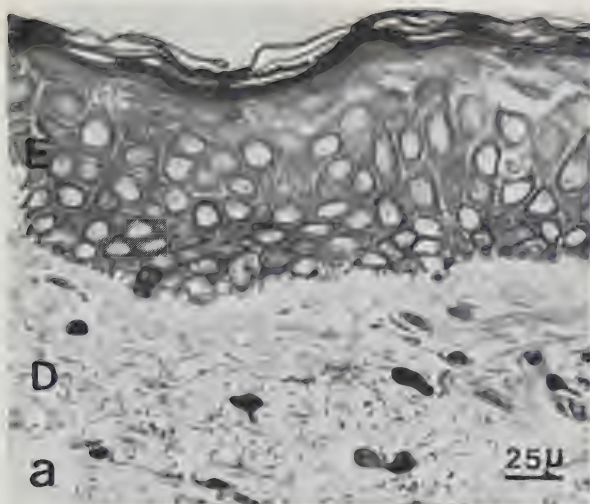


PLANCHE 6

*Ultrastructure de la peau humaine adulte
cultivée sur un milieu de Eagle BEM
7 fois concentré pendant 3 jours.*

Figure a : Epiderme basal (jonction dermo-épidermique, couche basale, première assise de la couche de Malpighi).

Les desmosomes, tonofilaments et mélanosomes sont conservés malgré une nécrose évidente des noyaux. La membrane nucléaire a disparu et la chromatine se rassemble en amas. L'épiderme commence à se séparer du derme (flèche). (x 12 500).

Figure b : Couches superficielles de l'épiderme. Les contours cellulaires sont moins sinueux mais les desmosomes sont très rapprochés les uns des autres. (x 12 500).

c : collagène ; D : derme ; d : desmosome ; ei : espace intercellulaire ; f : tonofilaments ; mb : membrane basale ; me : mélanosome ; N : noyau.

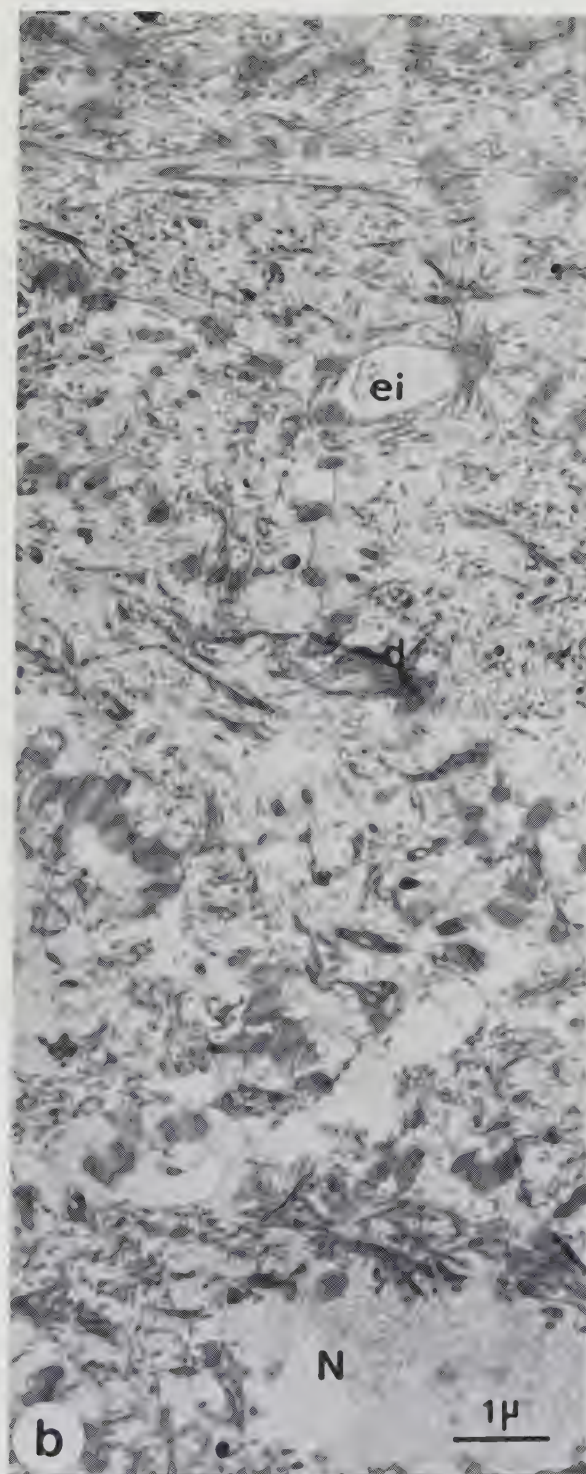
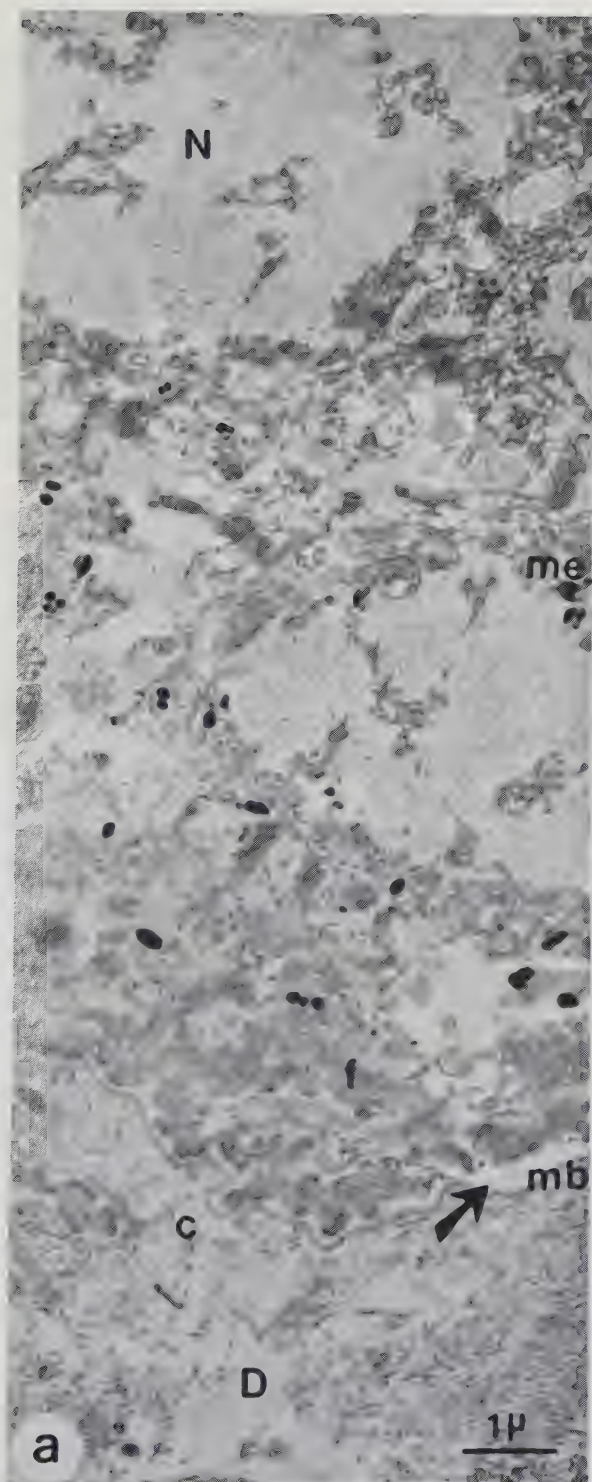


PLANCHE 7

*Croissance et différenciation de la peau humaine
adulte ou de nouveau-né cultivée sur milieu n° II.*

Figure a : Structure histologique d'un fragment de peau humaine adulte du bras avant l'explantation (x 375).

Figure b : Après 3 jours de culture, on note la présence de mitoses (flèches) et l'augmentation de l'épaisseur de l'épiderme (x 375).

Figure c : Après 7 jours de culture, les mitoses sont plus nombreuses (flèches). Au-dessus de la couche de kératohyaline, une couche de cellules parakératotiques apparaît (x 375).

Figure d, : Un plus fort grossissement nous montre une mitose en anaphase (x 936).

Figure e : Après 10 jours de culture, une ou 2 couches de cellules à la base de l'épiderme restent vivantes (x 375).

Figure f : Aspect d'un explant de peau humaine du dos de nouveau-né (2 mois) après 19 jours de culture (x 300) (semi-fine).

D : derme ; E : épiderme ; kh : kératohyaline ; NP : noyaux pycnotiques.

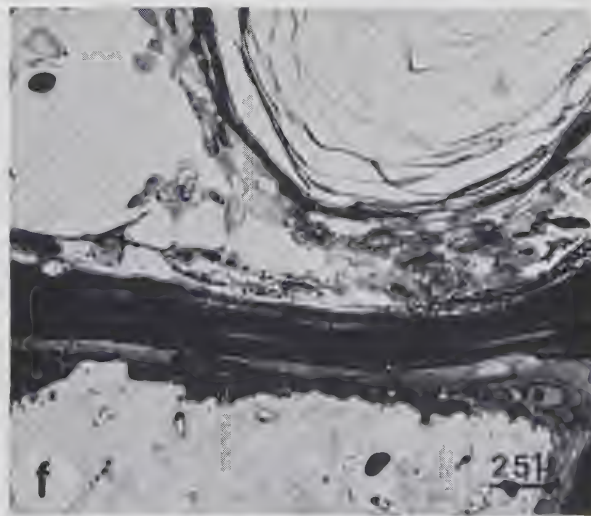
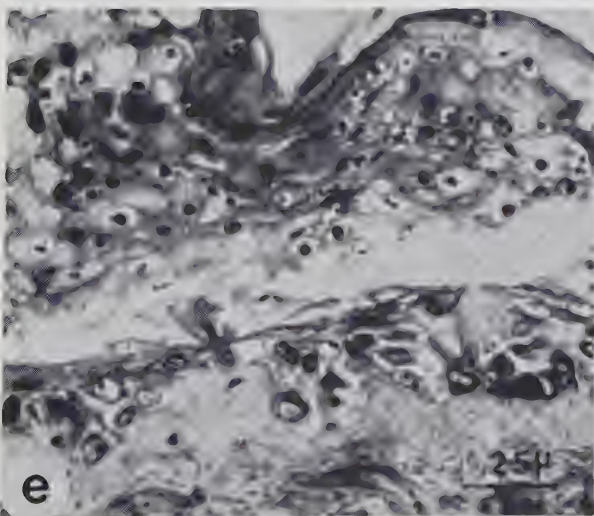
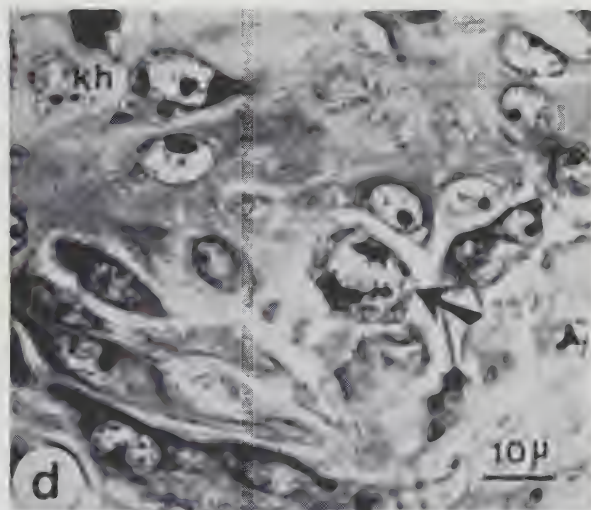
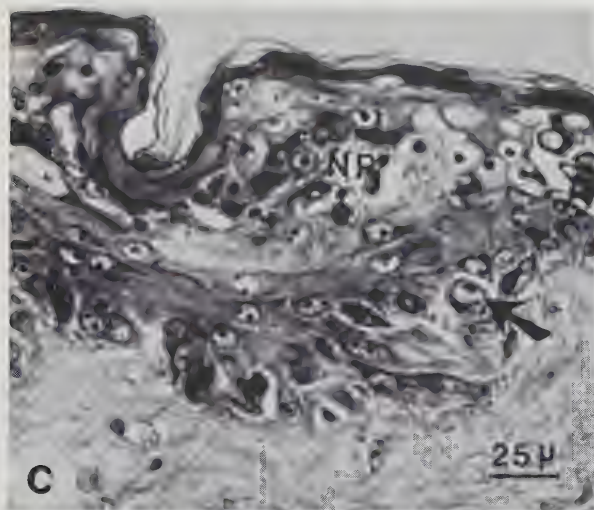
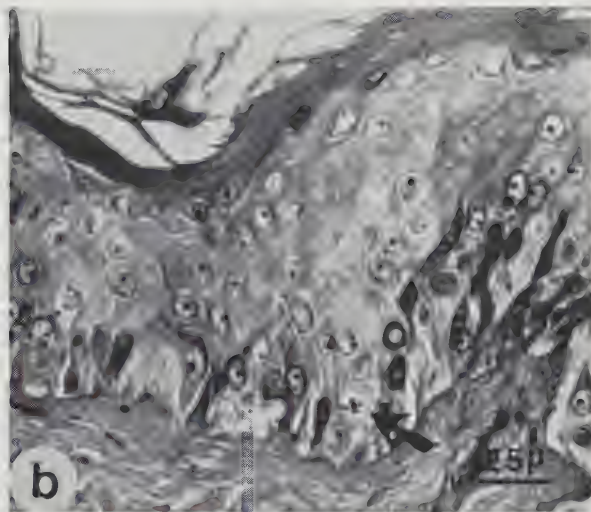
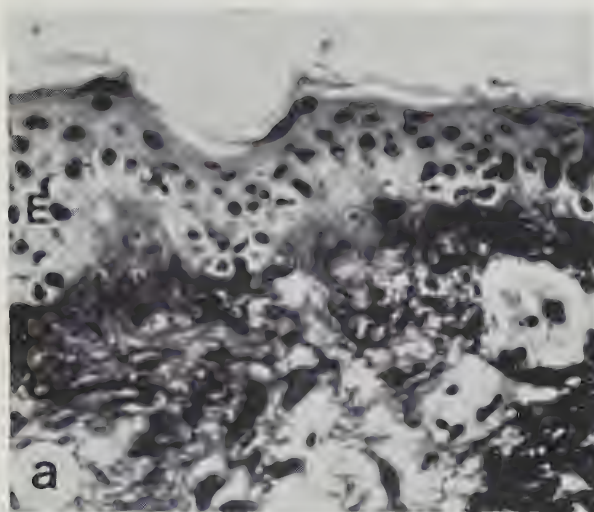


PLANCHE 8

*Ultrastructure de la peau humaine du bras
cultivée sur le milieu n° II pendant 7 jours.
L'épiderme basal.*

Les cellules basales sont parallèles à la surface ainsi que leur noyau. Elles sont jointives et l'espace intercellulaire est réduit. Les nombreuses microvillosités cytoplasmiques intercellulaires sont bien visibles sur la figure. (flèches).

La 1ère assise cellulaire de la couche de Malpighi est parallèle à la surface. (x 20 000).

c : collagène ; D : derme ; d : desmosome ; ei : espace intercellulaire ; f : tonofilaments ;
hd : hémidesomosome ; m : mitochondrie ; mb : membrane basale ; N : noyau ; n : nucléole ; re : réticulum endoplasmique.



PLANCHE 9

*Ultrastructure de la peau humaine du bras
cultivée sur milieu n° II pendant 7 jours.
Les couches superficielles de l'épiderme.*

Figure a : Couches supérieures de la couche granuleuse, couche claire, et couche cornée.
Les cellules de transition entre la cellule granuleuse et la cellule kératinisée est caractérisée par l'absence d'organites hormis les nombreux tonofilaments.

1 : (x 12 500)

2 : (x 22 000).

Figure b : Dernières assises de la couche de Malpighi.

Les cellules sont aplaties, le noyau ovale est parallèle à la surface. Les mitochondries sont encore nombreuses et ne présentent aucun signe de dégénérescence. (x 17 700).

cc : couche cornée ; d : desmosome ; ei : espace intercellulaire ; f : tonofilaments ; k : kératinosomes ; m : mitochondrie ; N : noyau ; n : nucléole ; r : ribosomes.

